

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2000-504213  
(P2000-504213A)

(43) 公表日 平成12年4月11日 (2000.4.11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 11/14		C 1 2 N 11/14	
5/06		11/02	
11/02		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/53		33/543	5 1 5 A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 66 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平9-525529  
(86) (22) 出願日 平成9年1月17日 (1997.1.17)  
(85) 翻訳文提出日 平成10年7月17日 (1998.7.17)  
(86) 国際出願番号 P C T / A U 9 7 / 0 0 0 2 0  
(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 2 6 3 2 4  
(87) 国際公開日 平成9年7月24日 (1997.7.24)  
(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 1 0 , 1 1 3  
(32) 優先日 平成8年1月17日 (1996.1.17)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 フリンダーズ・テクノロジーズ・プロプライエタリー・リミテッド  
オーストラリア5042サウス・オーストラリア州ベッドフォード・パーク、ザ・フリンダーズ・ユニバーシティ・オブ・サウス・オーストラリア  
(72) 発明者 カリオニス, ビル  
オーストラリア5050サウス・オーストラリア州ベルビュー・ハイツ、ジョージ・ロード13番  
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞内成分を用いる無傷細胞の固相強化

(57) 【要約】

本発明は、混合細胞集団から1以上の特定細胞を強化するための、簡単で費用の安い方法およびキットを提供する。本発明により、標的細胞は、外細胞膜または細胞壁を強調する細胞質における標的細胞の細胞内成分、例えば核酸、ペプチド、タンパク質などに接着する検出剤によって検出される。次いで、検出細胞は、免疫親和性または免疫磁気性システムを含む固相支持システムを用いて、細胞の混合集団から濃縮される。強化細胞は、同定剤およびシグナル生成システムを用いて、同定され、可視化される。本発明はまた、強化の前に標的細胞の選択細胞内成分を増幅することにより細胞混合集団からの細胞強化の感受性を高める方法を提供する。

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

1. 強化細胞複合体であって、
  - (a) 選択された細胞内成分を有する特定の細胞；
  - (b) 当該特定細胞の当該選択細胞内成分にハイブリダイズした検出剤；
  - (c) 当該検出剤に結合した固相支持体を含む強化細胞複合体。
2. 当該選択細胞内成分が核酸である、請求項1の強化細胞複合体。
3. 当該核酸を当該検出剤に接触せしめる前に増幅する、請求項2の強化細胞複合体。
4. 当該増幅核酸が当該検出剤により検出可能な標識をさらに含有する、請求項3の強化細胞複合体。
5. 当該選択細胞内成分がアミノ酸、ポリペプチドまたはタンパク質である、請求項1の強化細胞複合体。
6. 当該検出剤が抗体である、請求項1の強化細胞複合体。
7. 当該検出剤が遺伝子プローブである、請求項1の強化細胞複合体。
8. 混合細胞集団中の少なくとも1つの特定の細胞の固相強化法であって、
  - (a) 混合細胞集団を少なくとも1の検出剤（この検出剤は当該混合細胞集団中で当該特定細胞の選択細胞内成分に結合するものである）と接触せしめ、
  - (b) 固相支持システムを用いて当該検出剤により結合した当該選択細胞内成分を有する当該特定細胞を濃縮する、工程を含む方法。
9. 混合細胞集団を当該検出剤に接触さす前に固定剤で固定化し、透過剤で透過性を上昇する、請求項8の方法。
10. 当該選択細胞内成分を当該検出剤に接触さす前に増幅する、請求項8の方法。
11. 当該選択細胞内成分が当該特定細胞の細胞質内にある、請求項8の方法。
12. 当該選択細胞内成分が核酸である、請求項8の方法。

13. 当該核酸を当該検出剤に接触さす前に増幅する、請求項12の方法。

14. 当該核酸が当該検出剤で検出可能な標識をさらに含有する、請求項13の方法。

15. 当該細胞内成分がアミノ酸、ポリペプチドまたはタンパク質である、請求項8の方法。

16. 当該検出剤が抗体である、請求項8の方法。

17. 当該検出剤が遺伝子プローブである、請求項8の方法。

18. 工程

(a) 当該特定細胞を同定剤で同定し；

(b) 当該特定細胞をシグナル生成システムで目視化する、  
をさらに含む、請求項8の方法。

19. 当該特定細胞の細胞内成分の検出に基づき混合細胞集団からの少なくとも1つの特定細胞を強化するためのキットであり、

(a) 当該特定細胞の当該細胞内成分を検出する検出剤；

(b) 固相支持システム

をさらに含むキット。

20. (c) 固定剤；

(d) 透過剤

をさらに含む、請求項19のキット。

21. (e) 同定剤；

(f) シグナル生成システム

をさらに含む、請求項19のキット。

## 【発明の詳細な説明】

### 細胞内成分を用いる無傷細胞の固相強化

#### 発明の分野

本発明は、混合細胞集団に存在する特定の細胞種を強化することに関する。本発明は、細胞内成分に基づき、固相支持体を用いて、標的とする細胞種の濃縮および同定することを提供する。本発明はまた、標的細胞に存在する選択された細胞内成分を増幅することによって、混合細胞集団内の標的細胞強化の感受性を増加する方法を提供する。

#### 発明の背景

*in situ*ハイブリダイゼーションの技術は、単一の細胞レベルにおいて核酸およびタンパク質の検出および定量にとって有力な方法である。これには特定の遺伝子または遺伝子産物が含まれる。特定の遺伝子産物の存在の有無を検出できることは、正常細胞の代謝および分化についての遺伝子学的、生化学的、分子微生物学的な特徴化にとって重要なだけでなく、疾患および感染についての遺伝子マーカーの同定および検出においても重要である。例えば、多くの場合に遺伝疾患は、正常な細胞に存在しない細胞中の特定の遺伝子産物の有無によって特徴づけられる。さらに、感染物に罹った細胞は、正常の細胞では発現されない核酸およびタンパク質を発現する。

*in situ*ハイブリダイゼーションについての現在の方法の問題点は、細胞集団中に非常に少量しか存在しないときに、ハイブリダイズ細胞を容易に検出できないことである。細胞の手作業的検出は熟練技術者による顕微鏡スライドの走査を必要とし、これは手間と時間を要し、かつ非効率的である。*in situ*ハイブリダイゼーションにより同定された希少細胞について細胞大集団を走査するための自動的手段は、高度かつ高価なコンピュータ処理による光学的または蛍光的走査装置を必要とする。さらに、*in situ*ハイブリダイゼーションにより同定された特定の細胞は、典型的には分離して研究され得ない。また、検出された特定の細胞

についての遺伝学的、生化学的、分子生物学的研究は、細胞の全集団の存在において行われる。

希少細胞の強化は可能である。in situハイブリダイゼーションに続いての細胞強化についての現在方法には、2つのカテゴリーがある。固相支持体に基づく免疫磁気性または免疫親和性単離と蛍光細胞分析分離を用いるフローサイトメトリーとである。

in situハイブリダイゼーション後の固相支持体を用いての濃縮は、外細胞膜または細胞壁のタンパク質または抗原などの細胞外成分の検出に基づく細胞強化についての通常の方法である。この方法において、細胞外タンパク質または抗原は、固相支持体に直接的または間接的に結合する抗体と結びつく。固相支持体に直接的または間接的に結合し、抗体と結合した細胞は免疫磁気性または免疫親和性方法を用いて懸濁中の混合物から強化される。

固相支持体を用いる強化方法は、細胞表面上の特定のタンパク質または抗原の存在に基づく細胞を濃縮するのに用いられるが、外細胞表面または細胞壁のタンパク質または抗原が細胞強化のための適当な標的でない状態がしばしばある。さらに、細胞表面抗原は細胞から剥離されて、他の細胞に非特異的に結合することがあり、それによって強化の効率が低下し、強化される非標的細胞の割合が増加する。固相支持体に基づく現在の細胞強化方法は、独特の細胞内遺伝子または遺伝子産物を利用していない。

細胞内遺伝子産物は特定の細胞を特徴付けするのに用いられる。成長および分化の過程において、正常な細胞は細胞質内に特徴的な核酸およびタンパク質を発現する。多くの遺伝疾患は、細胞質または細胞の核中にのみ存在する特異的な遺伝子産物の出現の有無によって、生じたり、また診断され得ることが示されている。病原性または非病原性のウイルスが細胞質内でのみ見られる特殊なウイルス性核酸およびタンパク質を発現する。さらに、細菌、昆虫および動物の細胞は、細胞質内でのみ見られる組換えDNAまたは発現産物を含むプラスミドすなわちウイルスベクターを保有することができる。これらの核酸およびタンパク質の検出は、in situハイブリダイゼーションによってなされる。しかし、現在の方法

は、in situハイブリダイゼーションに続いてこれらの細胞を強化する手段を提供し得ない。

しかしながら、フローサイトメトリーおよびフローソーティングを用いて成分の *in situ* ハイブリダイゼーションによる検出に続いて細胞を強化することは可能である。参照、例えば、M. L. Mendelsohn, The Attributes and Applications of Flow cytometry in Flow Cytometry IV Proceedings of the IVth International Symposium on Flow Cytometry (Pulse Cytophotometry) 15-27, (Laerum et al. eds. 1979) Universitetsforlaget Oslo, Norway; L. Pajor et al., Biochemistry, 96:73-81(1991); Y-L. Zheng et al., Prenatal Diagnosis, 15:897-905(1995)。この方法において、細胞内核酸またはタンパク質は、蛍光色素で直接的または間接的に標識したプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションによって検出される。懸濁した細胞は一つずつフローチャネルによる検出器にかけられ、そこでは蛍光細胞センサーにより蛍光が検出され、蛍光細胞が選別されて解析される。しかし、他の不便な点に加えて、ソーティングに続くフローサイトメトリーには、熟練技術者と持ち運びできない高価な装置とを必要とする。

さらに、細胞強化についての現在の方法は、細胞数が少ないか、または遺伝子産物が少ないときに、検出の感度を増加することができない。

本発明は、細胞強化についての現在の方法に関するこれらの、あるいは他の欠点を克服する方法を提供する。

#### 発明の概要

本発明は、混合細胞集団中の特定の細胞種を強化する方法を提供する。本発明はまた、特定の細胞種の強化において形成される強化細胞複合体を提供する。さらに、本発明で使用する要素は、本発明方法による特定の細胞強化のためのキットとなすことができる。

本発明に従い、混合細胞集団中に存在する“特定の”または“標的”細胞の強化は、固相支持システムを用いて実施される。

固相支持システムは、混合細胞集団中に存在する非標的細胞からの強化細胞複合体の分離をもたらす。ここで用いられるところの“強化細胞複合体”は、標的

細胞、標的細胞の細胞内成分にハイブリダイズした検出剤および固相支持体の組み合わせを意味する。

一般に、本発明の方法は、固定剤で混合細胞集団を固定すること、透過剤で混合細胞集団の透過性を上昇すること、標的細胞の“選択された”または“標的”細胞内成分を検出剤を用いて検出すること、および固相支持体を用いて標的細胞を濃縮することを含み得る。

本発明に適した固定剤は当該技術で知られている。好ましい固定剤には架橋固定剤または沈降固定剤がある。架橋固定剤としては、例えば、ホルムアルデヒド、ホルマリン、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド-グルタルアルデヒド混合物、 $\alpha$ -ヒドロキシアジピアルデヒド、アクロレイン、ジメチルスベリミデートおよびエチルジメチルアミノ-プロピルカルボジイミドがある。沈降固定剤としては、例えば、酢酸またはアセトンと混合したエタノールまたはメタノールおよびアルコール-エーテル混合物がある。

固定した後に、混合細胞集団は透過剤により透過性を上昇することができる。本発明によると、適当な透過剤は、細胞質に下記検出剤の到達を容易にし、かつ無傷および生存の標的細胞の強化を阻害しない化合物である。好ましい透過剤には、関連タンパク質から核酸を剥がし、細胞質への検出剤の到達を可能にする細孔を形成し、あるいは外細胞膜から脂質を抽出し、そして基本的な細胞質に検出剤が到達するのを可能とするものである。タンパク質から核酸を剥がすための好ましい透過剤には、例えば、動物細胞についてはプロテイナーゼK、プロナーゼE、ジスパーゼ、ジアスターゼ、パパイン、トリプシンおよびペプシン/HCl；植物細胞についてはセルラーゼまたはペクチナーゼ；および細菌細胞についてはリゾチームがある。外細胞膜から脂質を抽出する透過剤は、既知であり、例えば酢酸などの酸またはアセトンを含む他の化合物と併用するエタノールまたはメタノールなどのアルコールがある。本発明に適した他の透過剤には、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、CHAPS（商標名）、Triton-X100（商標名）、Brij35（商標名）およびBrij58（商標名）などの界面活性剤がある。さらに、ホルムアルデヒドおよびアルコールを基剤とする固定剤などの固定剤は、透過剤として

も働き、さらなる透過性の上昇を不必要とする。透過性上昇は、凍結-水解方法のような機械的手段を用いても達成される。

本発明による他の強化法は、細胞または選択細胞内成分が少量であるときに、細胞内成分の増幅によって標的細胞の感受性または検出を増加せしめる。本発明によって、所望の細胞内成分の増幅は、好ましくは混合細胞集団の透過性上昇に続いて、検出剤に透過細胞を接触さす前に、実施される。

透過性上昇の後に、混合細胞集団は、その集団の標的細胞に存在する標的細胞内成分に特異性を有する少なくとも1つの検出剤と接触せしめる。本発明による検出剤には、遺伝子プローブ、抗体、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖、ポリヌクレオチド、酵素、補酵素、補因子、抗生物質、ステロイド、ホルモンまたはビタミンがある。一般に、本発明の検出剤は、下記する固相支持システムを用いて標的細胞の濃度にとって十分に安定であるように、細胞内成分に接着する。

標的細胞が検出剤の使用によって検出されると、固相支持システムが検出標的細胞を濃縮するのに用いられる。標的細胞は、検出剤を固相支持システムに結合することにより濃縮される。検出剤は、固相支持システムが検出剤の標識を検出し、それに結合できるように、標識される。別法として、標識の必要なしに、結合検出剤が検出されて、固相支持システムに結合され得る。

本発明によると、固相支持システムは、固相支持体および細胞集団において標的細胞を非標的細胞から分離するのに必要な他の要素を含む。本発明の固相支持システムに適した固相支持体は既知であって、例えば磁化性粒子、シリカ、アガロース、ガラス、デキストラン、繊維支持体、セルロースおよび合成ポリマー、および他の支持体がある。好ましい固相支持には超常磁性粒子が含まれる。固相支持システムにはまた、混合細胞集団において強化細胞複合体を他の細胞から分離するためのメカニズムを含み、例えば磁化性粒子固相支持体の場合には固相支持システムに磁場が含まれる。

標的細胞集団が強化されると、標的細胞は固相支持体から放離せられる。標的細胞強化は完全な特異性を欠くので、放離標的細胞はさらに、同定システムを用いて同定され、シグナル生成システムを用いて可視化される。本発明によると、

“同定システム”はシグナル生成システムに直接的または間接的に結合した同定剤を用いて標的細胞を同定する。同定剤は、結合検出剤に結合することにより、



または標的細胞の細胞内または細胞外成分に直接的に結合することにより、標的細胞を同定する。別法として、同定システムは、固相濃縮の前に細胞内成分にハイブリダイズした検出剤であり得る。

シグナル生成システムは強化標的細胞の可視化をもたらす。シグナル生成システムは同定剤中に組み込まれるか、あるいは同定剤に結合する化合物中に組み込まれる。もし同定剤が検出剤であると、シグナル生成システムは固相強化の前に検出剤に組み込まれたり、組み込まれなかったりし得る。

本発明はまた、標的細胞の細胞内成分に特異的な検出剤を用いて混合細胞集団から少なくとも1つの特定の細胞を強化するためのキットを提供する。本発明の実施態様において、キットは、上記したように、固定剤、透過剤、検出剤および固相支持システムが含まれる。キットはさらに同定剤およびシグナル生成システムを含み得る。キットは、単一の特定細胞の同定のための単独の検出剤、あるいは複数の細胞内成分の存在に基づいて複数の特定の細胞種を検出または単一の特定細胞種を検出するための複数の検出剤を含み得る。

#### 発明の詳細な説明

混合細胞集団における特定の細胞の濃縮のために固相支持体を用いることは、混合細胞集団から特定細胞を強化するために簡単で効率的な手段を提供する。好ましくは、強化細胞は、その後の過程のために無傷で生存しているものである。

本発明は、“強化細胞複合体”を提供し、固相支持システムを用いて、細胞の混合集団中に存在しているであろう少なくとも1つの特定細胞を強化する方法を提供する。本発明によると、“特定の”または“標的”細胞は、固相支持体を利用して強化され、本明細書に記載の検出剤により検出される細胞内成分を有する細胞が濃縮される。標的細胞が検出剤に結合するとすぐに、その細胞は固相支持システムを用いて混合細胞集団から分離され得る。標的細胞、検出剤および固相支持体の組み合わせを“強化細胞複合体”と呼ぶ。

本発明は、標的細胞の強化集団をもたらすのみでなく、特定の細胞種を全く含

まない混合細胞集団をも産生する。混合細胞集団に標的細胞を含まない利点は下記に述べる。本発明はまた、特定の細胞の“選択された”または“標的”細胞内

成分を増幅することによって、標的細胞検出の感度を高めるための方法を開示する。

本発明による細胞の強化は、研究または医療の多くの分野で有用な強化細胞産物を提供する。本明細書で云う“強化”およびその派生語は、細胞集団に存在するであろう標的細胞の処置、検出および濃縮を意味する。

典型的には、本発明方法が用いられる細胞集団は、細胞の混合集団である。ここで云う“混合”細胞集団とは、ある細胞を集団中の1以上の細胞から識別できる同定可能な特性を有する1以上の細胞からなる集団を含む細胞集団を意味する。細胞の混合集団の例としては、胎児細胞および母性血細胞などの混合物を含み、ウイルス性、細菌性、糸状菌性の感染細胞および非感染細胞；ガン性細胞および非ガン性細胞；白血病性細胞および非白血病性細胞；骨髓および血液の造血細胞；組換え形質転換細胞および非形質転換細胞；分化細胞および非分化細胞；細胞発現変異遺伝子および野生型遺伝子；識別可能な細胞内特性を有する1以上の細胞を含有する他の細胞集団がある。混合細胞集団は自然に生じるか、あるいは人工的につくられる。例えば胎盤材料から分離し、異種の血液や他の体液に混合した胎児細胞；異種の血液や他の体液に混合した細胞培地からのヒトまたは動物の細胞；または液体培地における細胞の他の組み合わせがある。

典型的には、本発明の混合細胞集団は懸濁液中に存在する。例として、血液、リンパ液、骨髓液、滑液、羊膜液、脳脊髄液、精液、脳室液、鼻咽頭粘液、喀痰、精液、尿、水、放出液、下水、糞便、動物および植物細胞培地、細菌および糸状菌強化培地、組織サンプルおよび物理的、化学的および酵素的手段により分割された腫瘍または臓器、または液体培地における細胞の他の組み合わせがある。

本発明による“標的”また“特定の”細胞には、本発明によって強化され得るすべての細胞が含まれる。一般的には、標的細胞は、細胞の混合集団における標的細胞を他の細胞と識別できる検出可能な1以上の細胞内特性を有する。

先行技術の固相強化システムは典型的に標的細胞の同定のために細胞外特性に基づいている。しかし、いくつかの細胞産物、例えばタンパク質は、細胞内と細胞膜上の両方に分布しているのに対し、多くのタンパク質は細胞内にのみ認めら

れる。さらに、核酸は一般に細胞外産物としてはみられない。例えば、真核生物においてRNAは細胞核で産生されて、細胞質に運ばれる。DNAは真核生物において主に核にみられる。そのために、タンパク質または核酸などの多くの細胞産物が無傷の細胞で細胞内または細胞質内に専らみられるので、固相支持体を用いて混合細胞集団における細胞を強化または消失せしめるために魅力的な標的とは考えられていなかった。

先行の固相強化システムと異なり、本発明は標的細胞を強化するため細胞外または膜外特性には依存しない。むしろ、本発明は1以上の細胞内成分の検出に基づく細胞の強化を提供する。“細胞内”によって、標的成分が外細胞膜または細胞壁の細胞内状態によることを意味している。しかし、細胞内要素が専ら細胞内でみられることを要しない。

本発明による細胞内成分には、例えば核酸、アミノ酸、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、脂質、代謝物、補因子、ポリサッカライド、ホルモンまたは本発明の検出剤により検出できる他の細胞要素を含む。さらに、細胞内成分は、細胞にとって内因性であることを要さず、むしろ外因性の細胞内源、例えばプラスミド、ファージ、ウイルス、細菌、プロトゾア、寄生物、マイコプラズマ、糸状菌または他の同様の源から得られる。デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質は、本発明の標的細胞強化のための好ましい細胞内成分である。

細胞内成分に基づく無傷かつ生存細胞の強化において克服する必要がある問題は、例えば細胞形態の保持、核酸統合性の保持、ペプチドまたはタンパク質の抗原性の保持および細胞内成分への固相支持体の到達性である。本発明によって、細胞形態、核酸統合性およびタンパク質抗原性が固定化、透過性上昇、in situ検出および続いての固相支持システムを用いた濃縮の間、保持されることが分かる。さらに、無傷細胞の透過性上昇およびin situ検出に続いて、細胞質への充分な到着および外細胞膜または細胞壁を強調する露出細胞質における充分な検出

剤があり、固相支持体を用いて混合集団から特定の細胞を濃縮するのを可能とすることが分かる。

一般に、本発明方法により強化された細胞は形態学的に無傷である。好ましくは、強化細胞は生存性である。ここで云う“生存”細胞は、解剖学的、遺伝子学的、生物学的、形態学的、生理学的、薬理学的研究または細胞を強化する他の目的のために適している細胞である。好ましくは、本発明の特殊性および感受性が混合細胞の大集団から少数の特定細胞の強化をもたらす。しかし、標的細胞が極端に少ないか、あるいは細胞内成分が細胞質に少ししか存在していないときは、本発明の一つの実施態様が選択された細胞内成分の増幅によって標的細胞の検出を高める。

本発明による細胞の混合集団に存在する特定の細胞の強化は、細胞の混合集団の前処置、細胞の混合集団の固定化、固定細胞の透過性上昇、透過細胞と標的細胞の選択細胞内成分に結合した検出剤との接触および固相支持システムを用いた検出剤に結合した標的細胞の濃縮を含む。

#### I. 細胞の前処理

本発明の細胞は様々な方法により前処理され得る。好ましくは、細胞は懸濁液中で処理される。細胞懸濁液は当分野において既知である方法を用いて製造される。例えば、細菌または動物の細胞培養培地を含む適切な培地における細胞の培養である。細胞懸濁液は、血液、骨髓、リンパ液および滑液のような体液からも用意され、あるいは、好ましくは単一細胞懸濁液を供する既知である物理的（例えば接着細胞を切断し、刻み、はぎ取り、ふるいに分け、および引っ掻くといったこと）、化学的（例えばキレート化剤を加え、または加えずに二価陽イオンの脱落）または酵素的手段（コラゲナーゼ、ジスパーゼ、トリプシン、エラスターゼ、パパイン、プロナーゼ、ヒアルロニダーゼによる消化）を用い、非集合体組織、器官または腫瘍より製造される。これらの技術によりつくられる細胞は生きていかもしれないし、生きていないかもしれない。

酵素を標識として使用したとき、細胞の前処理の間、内因性酵素の不活性化が必要である。例えば、ペルオキシダーゼは、30分間、メタノール中1%過酸化

水素（V/V）で処理すると不活性化される。30分間の0.2M H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>による細胞処理は、シグナルのノイズ比を改善するのに時々使用される。

通常、細胞懸濁液は、0℃から25℃で、好ましくは4℃で、1-60分間、好ましくは15分間、100×gから4000×g、好ましくは約400×gの遠心分離によりペレット化する。上清を除去し、細胞を以下に述べるように固定する。

## II. 固定化細胞

本発明により、細胞の混合集団は固定剤で固定される。本明細書で用いる固定剤は、強化（例えば浸透圧による障害や自己消化等の妨止）後、生存細胞を提供する化合物である。好ましくは、固定液は、インビボでの細胞構造を正確に保持する結果をもたらし、固定化における細胞材料の無駄を最小限にし、細胞は本来のサイズを保つ。細胞内成分の反応性が検出可能ほど十分高く保たれることも望ましい。固定液の選択は、使用する材料およびプローブおよび必要とする感受性のレベルに依存する。強化を妨げない固定剤であって、細胞を強化するという目的上、強化細胞が無傷かつ生存可能であるように混合細胞集団を固定する固定剤は、いずれも本発明に適している。

好ましい固定液には、架橋固定液または沈降固定液として作用するものを含む。好ましい架橋固定剤には、ホルムアルデヒド、ホルマリン、グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド-グルタルアルデヒド混合液、 $\alpha$ -ヒドロキシアジピアルデヒド、アクロレイン、ジメチルスベリミデートおよびエチルジメチルアミノプロピルカルボジイミドを含むが、それらに制限されない。好ましい沈降固定液には、好ましくは3:1の割合で酢酸と混合したメタノールまたはエタノール、好ましくは1:1の割合でアセトンと混合したメタノール、メタノールのみ、95%アルコールおよびアルコール-エタノール混合液を含むが、それらに制限されない。

本発明の実施態様では、リン酸緩衝塩溶液（PBS）（PBS=0.15M NaCl, 10 mM Na-phosphate; pH 7.2）中、0.4%-10% (w/v)、好ましくは4% (w/v) パラホルムアルデヒドで細胞を再懸濁し、0℃から50℃、好ましくは室温で、1から30分間、好ましくは10分間インキュベーションすることに

より細胞は固定され得る。固定液の除去は、PBSで2-20分間、好ましくは

5分間の洗浄で4-5回の洗浄により行われる。洗浄と洗浄の間では細胞は遠心分離によりペレットにする。

細胞の透過性が直ちに上昇しなければ、PBSのような等張の緩衝液で、濃度が約 $10^5$ から $10^2$  cells/ml、好ましくは約 $10^6$ から $10^9$  cells/ml、体積が5-500  $\mu$ l、好ましくは100  $\mu$ lとなるよう細胞を再懸濁する。

### III. 透過細胞

細胞は透過剤を用いて透過性を上昇させる。ここでの利用として、透過剤は、細胞質への下記検出剤の到達を容易にする化合物である。好ましくは、透過剤は、固相支持体による標的細胞の強化を阻害しない。細胞を強化するという目的上、無傷かつ生存可能な強化細胞を提供する透過剤は、いずれも本発明に適切である。好ましい透過剤には、関連タンパク質から核酸を剥がし、細胞質への下記検出剤の到達を可能とする細孔を形成し、または外細胞膜から脂質を抽出し、基底となる細胞質への検出剤の到達を可能とするものを含む。タンパク質から核酸を剥がすための、特に好ましい透過剤には、動物細胞ではプロテイナーゼK、プロナーゼE、ジスパーゼ、ジアスターゼ、パパイン、トリプシンおよびペプシン/HCl、植物細胞ではセルラーゼまたはペクチナーゼ、ならびに細菌細胞ではリゾチームを含む。細胞の凍結と水解の繰り返しまたは超音波照射のような非化学的手段もまた透過性上昇に利用され得る。細胞質への検出剤の到達を可能にする細孔を形成する透過剤には、ドデシル硫酸ナトリウム、CHAPS（商標名）、Triton-X 100（商標名）、Brij 35（商標名）およびBrij 58（商標名）のような界面活性剤を含む。外細胞膜から脂質を抽出する透過剤は当分野では既知であり、例えば酢酸のような酸またはアセトンを含む他の化合物と併用されるエタノールまたはメタノールのようなアルコールを含む。ホルムアルデヒドのような幾つかの固定液およびアルコールをもとにした幾つかの固定液は透過剤としても作用し、さらなる透過性上昇は必要ではないが、一般的に透過性上昇は推奨される。

好ましい実施態様では、15℃-42℃で、好ましくは約37℃で、1-18

0分間、好ましくは10分間、PBS緩衝液中1-500  $\mu$ g/ml、好ましくは約

10-100  $\mu$ g/mlの濃度であるプロテイナーゼKにより、固定細胞は透過性が上昇され得る。他の透過剤と併せて、プロテイナーゼK濃度、インキュベーションの時間および温度は、各細胞種について最適化される。透過性上昇は、プロテイナーゼK溶液を18℃-42℃で、好ましくは室温で、1-20分間、好ましくは2分間、PBS緩衝液中0.02%-2%(w/v)、好ましくは0.2%(w/v)であるグリシンで置換することによって停止する。グリシンでの反応停止は選択的な処置である。

抗体検出剤とともに利用する好ましい透過剤には、酢酸のような酸またはアセトンを含む当分野に既知の化合物と併用され得るエタノールおよびメタノールのようなアルコール（例えばエタノール-アセトン溶液（1:1））を含む。

一旦、透過性が上昇すると、細胞の固定は繰り返せる。その後の固定は任意である。前述の固定液および方法は細胞の後一固定に利用され得る。好ましい固定剤は、PBS中0.4%-10%(w/v)、好ましくは4%(w/v)パラホルムアルデヒドであり、0℃-50℃で、好ましくは室温で、約1-180分間、好ましくは10分間である。固定液の除去は、PBSで2-20分間、好ましくは5分間の洗浄で4-5回の洗浄により行われる。洗浄と洗浄の間では細胞は遠心分離によりペレットにする。

#### IV. 細胞成分の増幅

本発明の他の実施態様では、細胞または選択された細胞内成分が豊富ではないとき、細胞内成分の増幅により標的細胞の検出感受性が増大される。検出感受性の増大が望ましいとき、好ましくは増幅がこの処理段階においてなされる。

ある実施態様では、本発明は、特定の細胞内で少数しか存在していない選択核酸の増幅を提供する。好ましくは選択核酸はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を利用して増幅される。無傷細胞におけるin situ PCR増幅は、選択された核酸の量を増加させ、細胞内核酸の検出感受性を増大する。

懸濁液中の細胞におけるPCR増幅を果す方法は、当分野では既知である。その方法は、例えばJ. J. O'Leary et al., J. Clin. Path. 47:933-938 (1

994) に記載されている。

PCR増幅は、選択核酸配列の限定されたセグメントに相補的である二つのオリゴヌクレオチド配列の間においてなされる。例えば、G・R・Taylor, PCR: A Practical Approach, 1-13, (M・S・McPherson et al. eds. 1991) IRL Press, Oxford, England参照。DNA産物の増幅において、固定され透過性が上昇した細胞は、PCRの増幅に適する緩衝液  $50 \mu\text{l}$  -  $200 \mu\text{l}$ 、好ましくは約  $100 \mu\text{l}$  で再懸濁され得る。そのような緩衝液には、 $10 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH 8.4)、 $1 \text{ mM}$  -  $10 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、好ましくは  $1.5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $5 \text{ mM}$  から  $250 \text{ mM}$  KCl、好ましくは  $50 \text{ mM}$  KCl、 $50 \mu\text{M}$  -  $200 \mu\text{M}$  各dNTP、1 - 2ユニットのTaqポリメラーゼ、 $100 \mu\text{g/ml}$ ゼラチンおよび  $0.1 \mu\text{M}$  -  $0.5 \mu\text{M}$ 、好ましくは  $0.25 \mu\text{M}$  各オリゴヌクレオチドプライマー ( $T_m > 55^\circ\text{C}$ 、以下参照) が典型的に含まれる。サンプルをミネラルオイル  $75 \mu\text{l}$  で覆い、温度を  $90^\circ\text{C}$  -  $95^\circ\text{C}$  に5 - 10分間、好ましくは5分間上げると、細胞内の核酸が変性される。細胞は、 $90^\circ\text{C}$  -  $95^\circ\text{C}$  で15秒間から1分間、好ましくは約1分間、次に  $40^\circ\text{C}$  から  $60^\circ\text{C}$ 、好ましくは  $55^\circ\text{C}$  で30秒間から5分間、好ましくは約1分間、続いて  $70^\circ\text{C}$  から  $75^\circ\text{C}$  で30秒間から5分間、好ましくは約1.5分間の25 - 35サイクルで処置される。サイクルは、 $65^\circ\text{C}$  から  $80^\circ\text{C}$ 、好ましくは  $72^\circ\text{C}$  で5 - 20分間、好ましくは約5分間である最後の伸長で終了する。反応は、 $4^\circ\text{C}$  まで冷却し、および/または終濃度が  $10 \text{ mM}$  となるEDTAの添加により終了する。

典型的に、PCR増幅の前に、トリ骨芽球症ウイルス (AMV) 逆転写酵素またはモロニー Maus 白血病ウイルス (MoMuLV) 逆転写酵素のような逆転写酵素を用いて、RNA標的はDNAへと変換される。ポリA-mRNA鎖の3'末端においてオリゴ-p(dT)15プライマーを使って、またはmRNAテンプレート上の非特異点においてランダムプライマー-p(dN)6を使って、または特異的プライマーにより決定される部位において、逆転写酵素は相補的DNA (cDNA) を合成する。逆転写酵素合成は、当分野において既知である方法を使ってなされる。そのような方法は、例えばE・S・Kawasaki, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 21-27 (Innis MA., et al., eds



. 1990), Academic Press, San Diego, CAに記載されている。RNA産物の増幅において、固定され透過性が上昇した細胞を逆転写に適する緩衝液に再懸濁する。そのような緩衝液には、50 mM KCl、20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mg/mlウシ血清アルブミン、1 mM各dNTP、1ユニット/mlであるRNアシン阻害剤 (Promega Corporation, USA)、100 pmol/lランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドおよび200ユニットのMoMuLV (またはAMV) 逆転写酵素を典型的には含む。反応は室温で10分間インキュベートし、37℃から42℃で30-60分間インキュベートする。95℃で5-10分間の熱処理により反応は終了する。逆転写酵素でcDNAを合成した後、細胞を400×gでペレットにし、前述したように目的DNA配列を増幅する特異的プライマーを使ってPCR反応はなされる。PCR反応後に細胞から新しく合成した核酸が拡散するのを防ぐため、細胞を上述したように固定する。

加えて、当分野の当業者に既知の方法を用いて、標識したヌクレオチドの代わりにヌクレオチド (dNTP) の一つを使うことにより増幅過程において標識を核酸に組み入れる。例えばA.R. Leitch et al., In Situ Hybridization, Bios Scientific (1994), Oxford, England; B.D. Hames, et al., Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, (1988) IRL Press, Oxford, England参照。標識されたヌクレオチドには、例えばジゴキシゲニン-ヌクレオチド (例えばジゴキシゲニン-11-dUTP)、ビオチン-ヌクレオチド (例えばビオチン-16-dUTP) および蛍光色素-ヌクレオチド (例えばフルオレセイン-12-dUTP) を含むが、それらに制限されない。本発明の実施態様によると、増幅過程において標識が組み込まれると、下記の検出剤は標識を含む増幅核酸配列である。標識された核酸を含む標的細胞は、以下に述べるような固相支持システムを使って濃縮できる。代わりに、選択された核酸が増幅において標識されないならば、遺伝子プローブのような下記検出剤の使用が通常必要となる。

検出感受性の増大は、例えば細胞の混合集団からHIV (ヒト免疫不全ウイルス) などのウイルスで感染された細胞を検出および強化するのに役立つ。活性の

ある感染した細胞の存在は、逆転写酵素およびin situ PCRを使い細胞質のウィルスRNAを増幅することによって検出できる。

#### V. 検出剤

透過性上昇後、好ましくは、検出剤による選択細胞内成分のin situ 検出ができるよう充分に、細胞は透過性が上昇される。本明細書でいう“in situ 検出”とは無傷細胞における細胞内成分の検出を意味する。

本発明により、検出剤を利用することによって細胞内成分は検出される。“検出剤”とは、現在知られる、または後に発見されるいずれの化合物でもあって、他の細胞成分よりも優先的に“選択された”すなわち“標的である”細胞内成分に接着し、固相支持体との結合でそれ自体が検出される化合物である。典型として、本発明の検出剤は、特定の細胞を効果的に濃縮する下記の固相支持システムにおいて十分に安定であるように細胞内成分に接着する。接着は可逆的または不可逆的であり得るが、好ましくは可逆的である。接着の方法には、イオン結合、水素結合、共有結合、ファン・デル・ワールス引力、および静電引力を含むが、それらに制限されない。

本発明の適切な検出剤には、遺伝子プローブ、抗体、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖、ポリヌクレオチド、酵素、補酵素、補因子、抗生物質、ステロイド、ホルモンまたはビタミンを含む。

本発明により、好ましいことに検出剤は以下に述べる固相支持システムにより検出できる。

#### A. 遺伝子プローブ 検出剤

本発明の一つの実施態様では、選択された細胞成分は、検出剤である遺伝子プローブの結合（ハイブリダイゼーション）によって検出される。遺伝子プローブは、遺伝子または遺伝子産物を同定するのに利用される物質であり、DNA（デオキシリボ核酸）、RNA（リボ核酸）または合成オリゴヌクレオチドのような遺伝的材料となり得る物質である。遺伝子プローブには、グアニン、アデノシン、

ウリジン、チミジンまたはシトシンを含める通常の核酸構成物である天然のまた

は化学的な誘導体を含む。遺伝子プローブを使用するため、当分野において既知であるin situ ハイブリダイゼーション法は、選択された細胞内核酸の検出に利用され得る。例えばB resserらの米国特許5, 225, 326参照。

もしin situ PCRの増幅が必要でないならば、前述の固定された細胞は非特異的ハイブリダイゼーションを妨げるためにプレハイブリダイズされる（以下に記述）。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションプローブを含む以外はプレハイブリダイゼーション溶液と同じ溶液で置換することにより行われる。

検出剤が遺伝子プローブであるとき、プローブが選択された核酸に接着する前、または選択された核酸に接着した後に標識を使用することによりプローブが検出可能となり得る。遺伝子プローブの検出を可能にするのに適切な標識には、ジゴキシゲニン、ホトジゴキシゲニン、ビオチン、ホトビオチン、2-アセチルアミノフローレン、スルホン基、水銀、蛍光色素、ジニトロフェノールおよびソラレンを含むが、それらに制限されない。他の標識には酵素基質、酵素阻害剤および補酵素がある。

#### 1. 検出剤としての遺伝子プローブのタイプ

本発明に適当な遺伝子プローブは、多くの供給源に由来し得る。遺伝子プローブはクローン化核酸であり得る。例えば、所望するDNAフラグメントをベクターに挿入し、適当な宿主細胞内で増幅し得る。次いで、増幅DNAを抽出し、プローブとして使用するために精製する。普通のベクターは、細菌プラスミド、細菌ウイルス、酵母人工染色体およびコスミドを含む。

遺伝子プローブは合成オリゴヌクレオチドであり得る。15から50塩基対の長さの合成オリゴヌクレオチドは、DNAシンセサイザーを使用して製造し得る。遺伝子プローブはポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅でき、この方法はプローブとして使用するDNAの両側に位置する適当なオリゴヌクレオチドプライマーの使用に依存する。プローブは二本鎖または相補的DNA（cDNA）のような二本鎖プローブ、または一本鎖DNAまたはRNAもしくはオリゴヌクレオチドのような一本鎖プローブであり得る。

## 2. 遺伝子プローブの標識

上記のように、検出剤は下記固相支持システムで検出可能である。遺伝子プローブは標識を使うことにより検出可能となる。標識は酵素的または化学的手段によりプローブに取りこむことができる。二本鎖プローブは、ランダムプライムDNA標識、ニック翻訳、ポリメラーゼ連鎖反応中のTaq DNAポリメラーゼでの標識のような既知の方法を使用して、DNAポリメラーゼを使用して標識できる。一本鎖プローブM13は、T3、T7、SP6のようなRNAポリメラーゼを使用して、RNAプローブへのインビトロ転写により製造できる。オリゴヌクレオチドはまた末端標識またはテイリングにより標識できる。

核酸プローブは種々の標識で酵素的に標識できる。これらは、ジゴキシゲニン、ビオチンおよびフルオロクロムを含むが、これらに限定されない。加えて、核酸プローブは、フォトジゴキシゲニン、フォトビオチン、2-アセチルアミノフルオレン、スルホン基、マーキュリー、フルオロクロム、ジニトロフェノールおよびソラレンを含むが、これらに限定されない種々の標識で化学的に標識できる。他の標識のタイプは酵素基質、酵素阻害剤およびコエンザイム化学ルミネッセ

ーおよび生物ルミネッセーを含むが、これらに限定されない。標識核酸プローブを製造する方法は当業者に既知である。例えば、A. R. Leitch, et al., In Situ Hybridization, Bios Scientific, (1994)Oxford, England;B. D. Hames et al., Nucleic Acid Hybridization:A Practical Approach, IRL Press, (1988)Oxford, England参照。

本発明の好ましい態様において、プローブはフルオロクロム-ヌクレオチドで標識される。異なるフルオロクロム-ヌクレオチドの各遺伝子プローブへの取りこみは、同じ細胞の1個以上の遺伝子プローブの同時検出を適当な放出波長フィルターおよびエピフルオレッセンスマイクロスコープの使用により可能にする。

上記方法は、標的細胞の細胞内成分とのハイブリダイゼーション前の遺伝子プローブの標識を含む。しかしながら、遺伝子プローブは、プライムドin situ標識(PRINS)の方法を使用して、標的へのプローブのハイブリダイゼーションに続

いて標識できる。例えば、Koch J. et al., Genet. Anal. Techniques Applications 8 : 171(1991)参照。この方法に従い、オリゴヌクレオチドの形のDNAプローブ、PCR産物またはDNAフラグメントを標的細胞核酸とハイブリダイズする。ハイブリダイズしたDNAは、続いて標識ヌクレオチドのその場での取りこみのプライマーとして作用する。DNA標的の標識のために、DNAポリメラーゼを使用する。RNA標的のために、逆転写酵素を使用し、RNA鋳型に沿った核酸を合成する。核酸プローブに酵素的手段により取りむことができる標識は、上記した。

### 3. プレハイブリダイゼーション

プレハイブリダイゼーションは、非特異的標的分子へのプローブのハイブリダイゼーションを最小化するために使用する任意の処理である。プレハイブリダイゼーション溶液は、一般に下記のハイブリダイゼーション溶液と同一であるが、プローブを欠く。本発明に従い、細胞を、例えば、50%ホルムアミド、 $2\times\text{SSC}$  ( $1\times\text{SSC}=0.15\text{M NaCl}$ 、 $0.015\text{M}$ クエン酸ナトリウム)、10%硫酸デキストランおよび遮断DNA(またはRNA)  $1\text{mg/ml}$ を含むプレハイブリダイゼーション溶液に再懸濁させる。遮断DNA(またはRNA)は、そうし

なければプローブまたは検出剤に結合するであろう細胞質または核内の分子と結合することにより、非特異的ハイブリダイゼーションを減少させる異種DNA(またはRNA)である。in situハイブリダイゼーションの方法に適当な他のハイブリダイゼーション溶液は、下記する。

プレハイブリダイゼーションは、好ましくは下記のハイブリダイゼーション反応と同じ温度で、30℃から50℃の範囲、好ましくは約37℃で30分から16時間、好ましくは約2時間行い、プローブの非特異的結合を遮断する。プレハイブリダイゼーション処理の温度および時間は、使用する細胞種およびプローブに依存して変わる。プレハイブリダイゼーションに続き、細胞をペレット化した後にプレハイブリダイゼーション液を除去する。

### 4. プローブおよび標的変性

ハイブリダイゼーション前に、全二本鎖核酸を変性しなければならない。一本鎖核酸プローブおよび細胞質内のmRNAは変性する必要はない。変性は、二本鎖核酸プローブおよび細胞質内の二本鎖DNAに必須である。二本鎖核酸プローブおよび細胞質内の二本鎖DNAの変性は、ハイブリダイゼーション前に別途行うことができる。二本鎖DNAを変性する方法は、アルカリまたは酸処理、加熱および有機溶媒を含むが、これらに限定されない。A. R. Leitch et al., *In Situ Hybridization*, Bios Scientific, (1994) Oxford, England; B. D. Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, (1988) IRL Press, Oxford, England参照。

本発明に従った変性の好ましい方法は、ホルムアミドのようなカオトロピック剤を含むハイブリダイゼーション緩衝液存在下での、二本鎖核酸プローブおよび染色体DNAの複合変性である(下記参照)。変性は、融点( $T_m$ )より約30℃上、通常70℃から90℃、好ましくは80℃で、2-20分、好ましくは10分間行い、プローブおよび核の染色体DNAを変性させる。 $T_m$ は、核酸の半分が一本鎖形で存在する温度と定義する。 $T_m$ および核酸の再アニーリングは、温度、pH、一価カチオンの濃度および有機溶媒の存在に影響される。

## 5. ハイブリダイゼーション

### a. ハイブリダイゼーション溶液

一般に、ハイブリダイゼーション溶液は、以下の成分を含み得る。

(i) 核酸ハイブリッドの $T_m$ を下げ、ハイブリダイゼーションを低温でも可能にするカオトロピック剤。これは、細胞が高温に長期間さらされた時に細胞形態が悪影響を受けるので、望ましい。核酸ハイブリッドの $T_m$ を下げ、ハイブリダイゼーションを低温で可能にするカオトロピック剤の例は、ホルムアミドである。ハイブリダイゼーションは、一般に30℃から45℃で、ハイブリダイゼーション混合物中に存在する30%-60%ホルムアミドと共に行う。ホルムアミドの存在は、 $T_m$ の約30℃上で加熱することにより、プローブおよび細胞性核酸の変性も可能にする。使用できる他のカオトロピック剤は、ヨウ化ナトリウム、尿素、チオシアナート、グアニジンおよび過塩素酸を含む。

(ii)一度形成されたハイブリッドを安定化する一価カチオン。ナトリウムイオンのような一価カチオンは、静電気により、核酸のリン酸基と相互作用する。静電的反発は塩濃度の増加により減少する。高塩濃度はミスマッチハイブリッドを安定化し、交差ハイブリダイジング種の検出を可能にする。

(iii)ハイブリダイゼーション緩衝液。典型的に、ハイブリダイゼーション緩衝液は、20-50 mMリン酸、pH 6.5-7.5緩衝液を含む。ハイブリダイゼーション反応が5から9のpH範囲で行われる限り、ハイブリダイゼーション速度はpHに依存する。

(iv)そうしなければプローブまたは検出剤を結合するであろう、細胞質内の分子または核を結合させることによる非特異的ハイブリダイゼーションを減少させるための非特異的DNA(またはRNA)である遮断DNA(またはRNA)。この目的のために使用するDNAは、平均100-200塩基対フラグメントまで、物理的または化学的手段によりフラグメント化する。通常使用される遮断DNAは、ウシ胸腺DNAおよび魚精子DNAである。ポリ(C)およびポリ(A)のようなオリゴヌクレオチドもまた使用できる。

ハイブリダイゼーション溶液は、また以下の任意の成分も含み得る：

(i)水性溶液中で強く水和し、巨大分子により水和水の接近を防止し、それによりプローブ濃度および結果的にハイブリダイゼーション速度を増加させるポリマー。例は、硫酸デキストラン、ポリエチレングリコールおよび類似のポリマーである。フェノールのような非ポリマーもまたハイブリダイゼーション速度を増加させるために使用できる。

(ii)細胞質へのプローブ浸透を助ける湿潤剤および透過剤として作用する、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、CHAPS(登録商標)、トリトン-X100(登録商標)、Brij35(登録商標)およびBrij58(登録商標)のような界面活性剤。

(iii)二本鎖DNAを非常に安定化できるカチオンを除去するためのEDTA、クエン酸または類似の試薬のようなキレート化剤。

(iv)ウシ血清アルブミン(BSA)またはデンハルト試薬(0.02%フィコール、0.02%ポリビニルピロリドンおよび0.02%BSA)も非特異的ハイブリ

ダイゼーションを減少させるために包含させ得る。

本発明に適当なハイブリダイゼーション溶液は、30%–60%、好ましくは50%ホルムアミド、 $0.1\times-6\times$ SSC、好ましくは $2\times$ SSC、5%–10%(w/v)、好ましくは10%(w/v)硫酸デキストラン、 $0.1\mu\text{g}-10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、好ましくは $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 魚精子遮断DNA、 $1-10\text{ng}/\mu\text{l}$ 、好ましくは $5\text{ng}/\mu\text{l}$ の各標識プローブを含む。in situハイブリダイゼーションに適当な他のハイブリダイゼーション溶液を使用でき、当業者に既知である。例えば、A. R. Leitch et al., In Situ Hybridization, Bios Scientific, (1994) Oxford, England; B. D. Hames et al., Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, IRL Press, (1988) Oxford, England参照。

#### b. ハイブリダイゼーション条件の決定

一般に、ハイブリダイゼーション条件は、形成するハイブリッドのタイプ（すなわち、DNA：DNAまたはDNA：RNAまたはRNA：RNA）および配列が密接に関連しているか、あまり関連していないかに依存する。本発明の適当なハイブリダイゼーション条件は、十分に適合したハイブリッドの形成を、非常に厳密な条件を使用して促進させるものである。

#### (i) 遺伝子プローブのサイズおよび濃度

最大ハイブリダイゼーション速度は、復元速度が一本鎖プローブ長の平方根に比例しているため、長いプローブで得られる。しかしながら、in situハイブリダイゼーションのために、プローブはまた、細胞の密集マトリックスへの十分な拡散をするのに十分小さくなければならない。本発明に適当な核酸は、100bp–10000bp、好ましくは200bp–400bp長である。本発明に適当なオリゴヌクレオチドプローブは、約15bp–50bpサイズである。

プローブ濃度は、ハイブリダイゼーションの速度制限段階である凝集反応の速度に影響し、最初の数個の塩基対の形成に関係する。一度凝集が起こったら、隣接塩基対が形成され、ジッパー効果を得る。プローブ濃度が高いほど、アニーリング速度が高いが、非常に高いプローブ濃度では、背景シグナルが産生される。アニーリング速度を過剰な背景シグナル無しで増加させるプローブ濃度が好まし



い。好ましいプローブ濃度は、約1から10 ng/ $\mu$ l、好ましくは約5 ng/ $\mu$ lである。

#### (ii) ハイブリダイゼーション温度

ハイブリダイゼーションは、変性核酸が融点( $T_m$ )の丁度下の温度に維持されているハイブリダイゼーション溶液中で、相補的鎖に再アニールする変性核酸の能力に依存する。核酸再アニーリングについての広い最大速度は、 $T_m$ の20℃から30℃下で起こる。

本発明で適当なハイブリダイゼーション緩衝液は、カオトロピック剤であるホルムアミド(50%–60% v/vで)を含み、DNA:DNAおよびDNA:RNAハイブリッドに関しては、30℃から45℃、好ましくは37℃から42℃、およびRNA:RNAハイブリッドに関しては50℃から60℃、好ましくは55℃のハイブリダイゼーション温度を用いる。

#### c. 非特異的結合遺伝子プローブの除去

ハイブリダイゼーション溶液を除去し、細胞懸濁液を洗浄して、非特異的結合プローブを除去する。洗浄緩衝液、洗浄時間、温度および洗浄の頻度は使用するプローブに依存して変化する。非特異的結合プローブの除去は、完全適合二本鎖の $T_m$ より約5℃から25℃低く、0.01×SSC–2×SSC、好ましくは0

1–1×SSCの低塩濃度の高厳密性の条件下で通常行う。in situハイブリダイゼーションに適当な他の洗浄緩衝液は、当業者に既知である。例えば、A. R. Leitch et al., In Situ Hybridization, Bio Scientific (1994) Oxford, England; B. D. Hames et al., In Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, (1988) IRL Press, Oxford, England参照。洗浄は通常、緩衝液を洗浄各2–20分毎に、好ましくは各5分毎に数回変えて行う。細胞を洗浄間に遠心によりペレット化する。使用する洗浄緩衝液の全容量は、ハイブリダイゼーション溶液の最初の量の5–10倍でなければならない。

in situハイブリダイゼーションおよび洗浄に続いて、細胞を100×gから4000×g、好ましくは400×g、0℃から25℃、好ましくは4℃で1–

60分、好ましくは15分の遠心により濃縮し、続いて適当な容量のPBSに再懸濁する(下記参照)。

#### B. 抗体検出剤

本発明の他の態様において、抗体は検出剤であり得る。抗体は抗原または適当な担体に結合したハプテンに応答して血漿細胞により製造されるタンパク質である。抗原はタンパク質、ペプチド、ポリペプチド、炭水化物、核酸、アミノ酸、脂質、代謝物およびタンパク質標識を含む。

抗体は二つのタイプがある：同じ抗原分子の異なる部分と反応するポリクローナル抗体または一つの抗原決定基に特異的なモノクローナル抗体。両方のタイプの抗体とも本発明に適している。両方のタイプの抗体の製造法は当業者に既知である。例えば、Antibodies: A Laboratory Manual(Harlow E. et al., 1988編), Cold Spring Harbor Press, New York, USA; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Goding, JW. 1986編) Academic Press, London, England参照。

抗体は、標的細胞内の選択した細胞内成分に結合することにより検出剤として働く。従って、本発明で使用する限り、“ハイブリダイゼーション”なる用語およびその派生語は、検出剤が抗体、遺伝子プローブまたは本明細書に記載の検出剤の機能を行う他の試薬であれ、検出剤の細胞内成分への結合を意味するように

使用し得る。抗体検出剤は、好ましくは下記の固相支持システムにより検出可能である。

抗体をハイブリダイゼーションさせる前に、混合した細胞集団を遮断溶液と共にインキュベートし、抗体が非特異的部位に非特異的にハイブリダイゼーションするのを防ぐことができる。遮断溶液は、当該分野で公知であり、例えば、0.5% - 2%のウシ血清アルブミン、0.5% - 5%正常血清または0.5% - 5%無脂肪粉乳などの遮断剤を含有するpH 7.5の100 mM トリス/HCl、150 mM NaClあるいはPBCまたはSSCを含有し、0.05% - 0.2% Tween 20(商標名)またはSDSまたはTritonX-100(商標名)などの界面活性剤も含有し得る。

抗体検出剤は、単独でまたはいくつかの抗体との混合物として使用することができる。抗体は、非希釈から1:10, 000の範囲で希釈して使用し得る。使用する希釈度は各抗体について実験により決定するが、典型的にはポリクローナル抗体は1:10から1:100に希釈して使用し、モノクローナル抗体は1:500またはそれ以上に希釈して使用する。抗体を、30分間から24時間、好ましくは30分間から3時間、0℃から37℃で、好ましくは4℃で、透過性細胞と共にインキュベートする。抗体ハイブリダイゼーション溶液は、100 mM トリス/HCl (pH 7.5)、150 mM NaClあるいはPBSまたはSSCを含有し、0.5%–2%ウシ血清アルブミン、0.5%–5%正常血清または0.5%–5%無脂肪粉乳などの遮断剤を含有し得、また、0.05%–0.2% Tween 20 (商標名)あるいはSDSまたはTritonX-100 (商標名)などの界面活性剤も含有し得る。

抗体が結合した後、細胞を4–5回、各々2–20分間、好ましくは各洗浄につき5分間、0.5%–5%正常血清または0.5%–2%ウシ血清アルブミンを含有する100 mM トリス/HCl (pH 7.5)あるいはPBSまたはSSCを用いて洗浄する。洗浄緩衝液はまた、0.05%–0.2% Tween 20 (商標名)あるいはSDSまたはTritonX-100 (商標名)などの界面活性剤も含有し得る。細胞は各々の洗浄間に遠心によりペレット化する。

## V I. 固相強化

検出剤のハイブリダイゼーションにより検出された混合細胞集団中の細胞を固相支持システム (SPSS) を用いて濃縮する。好ましくは、本発明の固相支持システムは、混合集団中の複合体非形成細胞から強化細胞複合体を分離することにより標的細胞を濃縮する。“強化細胞複合体”は、標的細胞、検出剤および固相支持体の組合せを意味する。典型的には、強化細胞複合体は、固相支持体に結合している検出剤にハイブリダイズした細胞内成分を含む。

本発明では、固相支持システムは、細胞内成分にハイブリダイズした検出剤と結合できる固相支持体を含む。従って、固相支持システムは、検出標的細胞が固相に結合するためのリガンドまたは他の要素を含み得る。別に、検出剤は直接固

相支持体に結合し得る。固相支持システム（SPSS）は、また、混合細胞集団中の他の細胞から強化細胞複合体を分離する装置も含み得、例えば、磁化性粒子固相支持体の場合、SPSSは磁場を含むことができる。

#### A. 固相支持システム

##### 1. 固相支持体

本発明に適当な固相支持体は、当該分野で公知であり、例えば、磁化性粒子（例えば、Pourfarzaneth et al., The use of Magnetizable Particles in Solid Phase Immunoassay, Methods of Biochemical Analysis 28, 267-295 (D.Glick 編 1981) John Wiley, New York参照）、シリカ、アガロース、ガラス、デキストラン、繊維支持体、セルロースおよび合成ポリマー、および類似の支持体（例えば、Affinity Chromatography 12-145, (Lowe CR. et al. 編 1974) Wiley and Sons, London, England参照）を含む。

本発明において、好ましい固相支持体は超常磁性粒子である。本発明に適当な超常磁性粒子を製造する方法は当業者に既知である。例えば、S.Miltenyi et al., Cytometry 11: 231-238(1990); E.V.Groman et al., Biotechniques, 156-160(1985); J.T.Kemshead et al., Mol.Cell.Biochem 67: 11-18(1985); Pourfarzaneth et al., Methods of Biochemical Analysis 28, 267-295(D.Glick 編 1981)、John Wiley, New York参照。

##### 2. リガンド

固相支持システムは、検出剤を固相支持体に結合させるためのリガンドを含み得る。好ましくはリガンドは検出剤に特異的な結合親和性を示す。リガンドは、典型的には、固相支持体に結合させて固定する。一般的に、リガンドは自由溶液中で検出剤に対して  $K_d = 10^{-4}$  から  $10^{-8}$  M の範囲の解離定数 ( $K_d$ ) を有し得る。ストレプトアビジンまたはアビジンなどのリガンドを使用すると、ビオチン標識検出剤と極めて安定に結合 ( $K_d = 10^{-15}$  M) を形成することができる。リガンドは、その結合活性を損なうことなく固相に結合させることができる化学的に修飾可能な基を有することができる。化学的に修飾できる基には、アミノ、アルデヒド、カルボキシル、チオール、ヒドロキシルおよび水銀化塩基が含まれる。

。リガンドにおける化学的に修飾できる基の所在位置に関する情報が全くない場合には、試行錯誤で全体的に試みて、リガンドの結合活性を損なわず修飾可能な基を同定する。リガンドとしては、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖、ポリヌクレオチド酵素、補酵素、補因子、抗生物質、ステロイド、抗体、核酸、ホルモンまたはビタミンが可能である。リガンドの例は以下を含む；抗原：抗体相互作用（この場合のリガンドは合成ポリマーなどの固相支持体に結合できる抗体である）；糖タンパク質：レクチン相互作用（この場合のリガンドは合成ポリマーに結合できるレクチンである）；レセプター：リガンド相互作用（この場合のリガンドは合成ポリマー、例えばセファロース（商標名）に結合できる）。上記の例では、リガンドはアミノ基を介して固相支持体に結合できる。

上記の化学的に修飾可能な基を用いてリガンドを固相支持体に結合させる方法は当該分野で公知である。例えば、Affinity Chromatography、(Lowe CR. et al. 編 1974 Wiley and Sons、London、England) 参照。

遺伝子プローブを検出剤として使用する場合、好ましくは、リガンドは遺伝子プローブに組み込まれた標識に特異的に結合する。例えば、検出剤がビオチンで標識された遺伝子プローブである場合、固相支持システムの要素には、アビジンまたはストレプトアビジンが含まれる。また、リガンドは、標識反応で遺伝子プローブに取り込まれた特異的な標識に対して生じた抗体であってもよい。

検出剤が抗体である場合、固相支持システムの要素は、固相支持体に直接結合した二次抗体（リガンド）〔これは検出剤（一次抗体）に結合している〕を含み得る。

本発明の1つの態様において、リガンドは超常磁性粒子（固相支持体）に結合し得る。リガンドを超常磁性粒子に結合させる方法は当該分野で公知である。（例えば、S. Miltenyi et al. Cytometry 11:231-238(1990)；E.V. Groman et al.、Biotechniques、156-160(1985)；J.T. Kemshead et al.、Mol. Cell. Biochem 67:11-18 1985)；Pourfarzaneth et al.、Methods of Biochemical Analysis、28、267-295(D. Glick 編 1981)、John Wiley、New York 参照)

固相支持システムに一旦結合されると、強化細胞複合体が形成される。強化細

胞複合体は、標的細胞の細胞内成分に接着した検出剤（これは固相支持体に結合している）を有する標的細胞を含む。

しかし、組みあわせ方の中には、もし検出剤が固相支持体に直接結合しているならば、リガンドを削除することができるものもある。例えば、もし標的細胞中の標的細胞内成分がタンパク質であり、検出剤がかかるタンパク質に対して生じた抗体であるならば、抗体を化学的方法により固相支持体に直接結合させてもよい。別法として、もし細胞の標的成分が核酸であるならば、検出剤は、例えば化学的方法により固相支持体に直接結合した遺伝子プローブであってもよい。検出剤が直接固相支持体に結合していることは、検出剤として遺伝子プローブまたは抗体を使用する場合、固相が立体障害になる可能性があることから、細胞内成分へのハイブリダイゼーションの効率低下をもたらす可能性がある。

## B. 固相支持体への結合

### 1. 非磁気固相支持体

本発明の1つの態様において、非磁気固相支持体を使用し得る。これらの支持体はしばしばクロマトグラフィーカラムに充填され、10容量のカラム緩衝液を通して平衡化する。固相支持体の容量はカラムに加えた全細胞数および固相支持体の結合能力による。 $10^2 - 10^6$ の細胞集団は、抗体またはレクチンなどのタンパク質リガンド約1 mg/mlを含む固相支持体2 - 5 mlを用いて分離する。カ

ラム緩衝液は、分離する細胞型により選択し、最も頻繁にはトリス（トリス＝トリス [ヒドロキシメチル] アミノメタン）またはHEPES（HEPES＝N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸）の緩衝液を用い、アジ化ナトリウム（0.02% w/v）およびフィコール70（0.3% w/v）などの保護コロイド、ヒト血清アルブミン（0.3%）またはゼラチン（0.25%）を含有する。

好ましくは、混合細胞集団を固相支持体の容量の30%またはそれ以下の容量でカラムに加える。この比率は、絶対的ではなく、むしろ、強化効率の低下をもたらす可能性があるカラムへの添加過剰を防ぐために推奨するものである。細胞を固相支持体に通過させ、緩衝液を流すのを停止する。細胞を好ましくは約2 -

20分間、固相支持体と接触させて、強化細胞複合体を形成させ、ここで正確な接触時間は変化し得るが、インキュベーション時間が長い（すなわち、15-20分間）と特定の細胞種を取り出す効率が高くなり、一方、インキュベーション時間が短い（すなわち、2-10分間）と他の細胞と混じる危険性が少なくなる。

細胞を固相支持体と共にインキュベートした後、カラムを洗浄する。カラムの約20容量を用いて2-10ml/分の速度で緩衝液による洗浄を行い、固相支持体から細胞を取り出す（溶出）前に非特異的な結合物質を除去する。

## 2. 磁気固相支持体

前記したように、本発明に適した固相支持体には磁化性粒子が包含される。好ましくは、磁化性粒子は超常磁性粒子である。超常磁性固相支持体は一般的に平衡化する必要が全くないが、超常磁性粒子は使用する前に緩衝液で洗浄できる。細胞強化に使用する超常磁性粒子の量は、単離する細胞型および集団中の細胞の全数による。

一般的に、超常磁性粒子は以下の2種類のサイズ範囲に該当する： $>1\mu\text{m}$ 直径粒子、および $<150\text{nm}$ 直径粒子。直径が $>1\mu\text{m}$ の粒子では、例えば、コバルト・サマリウム永久磁石などの低勾配磁気系が必要とされる。直径が $<150\text{nm}$ の粒子では高勾配磁気系（ここでは、磁気スチール・ワイヤーがカラムに充填されている）が必要とされる。かかるカラムを強い永久磁石（0.6テラサ）

の電極間に配置すると、非常に大きい磁気勾配がワイヤーの隣に生じ、 $<150\text{nm}$ の粒子で覆われた細胞がワイヤーに引き付けられる。

### a. 低勾配磁気系

超常磁性粒子（ $>1\mu\text{m}$ ）に典型的であるように、粒子と全細胞数との比は細胞種により2:1から20:1の間で変化し、全細胞数は $10^6-10^9$ 細胞の間で変化し、容量は5 $\mu\text{l}$ （全細胞数 $10^6$ ）から5.0ml（全細胞数 $10^9$ ）の範囲で変化する。

PBSなどの緩衝液を使用し、これはアジ化ナトリウム（0.01%）およびウシ血清アルブミン（0.1%）またはウシ胎児血清（1.0%）を含有し得る。

磁気分離は典型的には37℃以下の温度で行う。

超常磁性粒子を上記の比率で細胞集団と結合させ、次いで、常に攪拌しながら2℃-12℃で5-30分間インキュベートする。固相支持システムに結合しているリガンドは検出剤と結合し、これは標的細胞の選択された細胞内成分とハイブリダイズし、強化細胞複合体を形成する。次いで、混合物を磁場におく。磁場は強化細胞複合体を引き付ける。非標的細胞はカラムを洗浄することにより分離される。

低勾配磁気システムにおける洗浄は、過剰な溶液を吸引することにより行う。磁化性粒子に結合した細胞はチューブの壁についたままである。次いで、チューブを磁石から取り出し、細胞を再び洗浄緩衝液(0.1% W/Vウシ血清アルブミンを含有するPBS)中に懸濁する。洗浄工程を4-5回繰り返し、非標的細胞を取り除く。洗浄に使用した緩衝液の総量は、粒子:細胞複合体が初めに形成された容量の5-10倍である。

#### b. 高勾配磁気システム

超常磁性粒子のサイズが<150nmのものを、これが非常に小さな粒子であることから、細胞に対して高い比率で使用する。典型的には、1000:1またはそれ以上の比率が好ましい。全細胞数は $10^6$ - $10^{10}$ の範囲で変化し、メッシュ面積は $10\text{ cm}^2$  ( $10^6$ - $10^7$ 細胞) から $10\text{ cm}^3$  ( $10^9$ - $10^{10}$ 細胞) で、用量は0.5ml ( $10^6$ - $10^7$ 細胞) から50ml ( $10^9$ - $10^{10}$ ) の範

囲で変化する。

低勾配磁気システムに上記の緩衝液を使用できる。磁気分離は通常37℃以下の温度で行う。

超常磁性粒子を上記の比率で細胞集団と結合させ、2℃から12℃で5-30分間、常に攪拌しながらインキュベートし、強化細胞複合体を形成する。

混合物を磁場の存在下でワイヤー・メッシュを含むカラムにのせ、サンプルをゆっくりとカラムに通過させる。0.1% W/Vウシ血清アルブミンを含有するPBSをカラム容積の3-5倍量用いてカラムを洗浄する。緩衝液を流すのを止め



、カラムを磁場からはずし、細胞を緩衝液を用いて逆流させる。再度カラムを磁場におき、緩衝液を流し続ける。最後に、再び流すのを止め、カラムを磁場からはずし、“磁気”細胞画分をカラムから集め、細胞を $400 \times g$ でペレット化することにより濃縮する。細胞を再び約 $100 \mu l$ のPBSに懸濁する。

### C. 固相支持体からの標的細胞の取り出し

強化細胞複合体の特定の細胞を固相支持体から取り出し、さらに、診断、治療または研究の目的に使用し得る。濃縮した特定の細胞を溶出して強化細胞集団を調製する方法は、固相支持体の型、固相支持体に結合するリガンドの型および固相支持体へのリガンドの結合形式により決定される。一般的に、溶出剤を使用して、固相支持システムから濃縮された標的細胞を取り出す。固相支持体からの特定の細胞の取得は、溶出に必要とされる溶出液の厳密性と溶出物質の生物活性の変化または欠失の危険性との妥協点で行う。溶出剤は、リガンド：検出剤複合体を維持するイオン結合、水素結合、共有結合、ファンデルワールス相互作用または静電力的力を弱める化合物を包含する。溶出は、pH変化、イオン強度の変化、溶出液、変形剤または電気泳動脱着剤の極性の変化といった変化を引き起こし得る。他の一般的な溶出法は、溶出剤が検出剤に対する結合またはリガンドに対する結合と競合する親和性溶出である。溶出は、単一の溶出液の濃度勾配または数種の溶出剤を用いたパルス溶出のいずれかにより行うことができる。(例えば、Affinity Chromatography, 52-70、C.R.et al.編 1974)、Wiley and Sons、London、England参照)。固相支持体を再生する必要がある場合には、リガンドを物理

的、化学的または酵素的な方法で壊して、標的細胞を得ることができる。

#### 1. 細胞から磁気粒子の除去

本発明の一実施態様では、固相支持体は超常磁性粒子である。 $< 150 nm$ 範囲の粒子は生体分解性であり、光学顕微鏡またはフローサイトメトリーでは見えず、強化後同定システムまたはシグナル生成システム（下記参照）のいずれとも接触しないので、この磁気粒子の除去を行う必要はない。除去が必要ならば、 $37^\circ C$ で一晩インキュベーションして、細胞から粒子を除去してもよい。 $> 1 \mu m$ 範

囲の粒子は、95%ホルムアミド中少なくとも65℃の温度で少なくとも2分間加熱するか、または0.1%SDSの存在下で5分間煮沸させるか、あるいは37℃で一晩インキュベーションすることにより、細胞から除去できる。ビオチン：アビジン（またはストレプトアビジン）同定システム（下記参照）を使う場合、切断可能なリンカーアームをビオチン分子に組込んだビオチン-ヌクレオチド類似体を使用して、超常磁性粒子から検出剤を解離させることができる。

## VII. 固相強化後の標的細胞同定

標的細胞強化によっては、完全に純粋な標的細胞集団を得ることはできない。従って、一旦、強化した細胞を固相支持体から溶離させ、好ましくは下記の同定システムおよびシグナル生成システムを用いて標的細胞を同定する。

本明細書で使用する“同定システム”とは、直接的または間接的にシグナル生成システムに結合させた“同定剤”を用いて標的細胞を同定するものである。一般に、同定剤とは、（強化の前に細胞内成分にハイブリダイズさせた）検出剤に結合することにより、または標的細胞の細胞内または細胞外成分に直接結合することにより標的細胞を同定するものである。よって、同定剤には、検出剤として前述した全ての化合物が含まれる。

核酸または抗体などの同定剤が細胞内成分と直接結合するならば、それは、検出剤が結合するのと同じかまたは異なる細胞内成分に結合できる。同定システムは標識を含むこともあり、この標識は、同定剤が結合する検出剤、細胞内成分または細胞外成分に組み込まれている。あるいは、同定システムは固相濃縮の前に細胞内成分にハイブリダイズした検出剤であってもよい。

シグナル生成システムは、標的細胞を可視化するものである。このシグナル生成システムは同定剤中に、または同定剤に結合する化合物中に組込むこともできる。同定剤が検出剤であるならば、このシグナル生成システムは固相強化の前に検出剤中に組込んでよく、また組込まなくてもよい。

強化した標的細胞を同定および可視化する方法は、採用した同定システムによって変わる。例えば、同定剤が、ジゴキシゲニン、2-アセチルアミノフルオレンス、スルホン基、水銀／トリニトロフェノール、またはビオチンなどで標識し

た核酸である検出剤に結合することによって標的細胞を同定するものである場合は、免疫細胞化学的同定剤がフルオロクロム、酵素による沈降 (enzyme-generated precipitate) または金属シグナル生成システムと共に使用できる。同定剤が、ビオチン標識した検出剤を同定するものである場合、アビジン (またはストレプトアビジン) 同定剤がフルオロクロム、酵素による沈降または金属シグナル生成システムと共に使用できる。使用した検出剤が、フルオロクロム-ヌクレオチドの組込まれた核酸プローブであった場合、これ以外の同定またはシグナル生成システムは何も必要ない。可視化は、蛍光による直接的なものであり得る。あるいは、免疫細胞化学的同定剤とフルオロクロム、酵素による沈降または金属シグナル生成を使用して、間接的に同定することもできる。

#### A. 同定システム

##### 1. 免疫細胞化学的同定剤

本発明によれば、免疫細胞化学的同定および可視化は、一段階または二段階の工程で実施できる。一段階工程では、検出剤に結合する抗体、検出剤に組込まれた標識、細胞内成分または細胞外成分にシグナル生成システムを結合させる。シグナル生成システムと結合した抗体 (同定剤) が抗原に結合することによって同定ができる。

二段階工程では、同定および可視化のために一次抗体および二次抗体が必要である。一次抗体は、検出剤などの抗原、検出剤に組込まれた標識、細胞内成分または細胞外成分に結合する。シグナル生成システムをもつ二次抗体は、一次抗体に結合する。二段階検出システムは、シグナル生成システムをもつ数種の二次抗

体が、シグナルを顕著に増幅させて可視化感度を強化する一次抗体に結合できるため、好ましい。

##### 2. ビオチン：アビジン (またはストレプトアビジン) 同定システム

ビオチン：アビジン (またはストレプトアビジン) 同定システムでは、ビオチン標識を使用する。ビオチン標識は固相強化前に検出剤に組込んでよく、またはこのビオチンは同定剤に組込んでよい。アビジン (またはストレプトアビジン) は、シグナル生成システムにコンジュゲートさせる。すると、このアビジン

(またはストレプトアビジン) はビオチンに結合する。このビオチン-アビジン複合体の増幅物は、ビオチニル化抗アビジン (またはストレプトアビジン) 抗体を添加し、次いで、シグナル生成システムにコンジュゲートさせた別のアビジン (またはストレプトアビジン) 層を添加することにより得られる。

ビオチン標識を用いる場合、免疫細胞化学的またはビオチン：アビジン (またはストレプトアビジン) システムのいずれかが標的細胞の同定に適している。免疫細胞化学的同定システムやビオチン：アビジン (またはストレプトアビジン) 同定システムを採用する方法は、当分野で知られている。例えば、Leitch, et al., In Situ Hybridization, Bios Scientific(1994), Oxford, England; B.D. Hammes, et al., In Nucleic Acid Hybridization: A practical Approach, (1988) IRL Press, Oxford, England 参照。

## B. シグナル生成システム

本発明によれば、同定剤によって同定された標的細胞の可視化は、シグナル生成システムの使用により遂行できる。本発明に適したシグナル生成システムは、同定剤に結合して標的細胞を可視化できるあらゆる化合物を含む。好ましいシグナル生成システムには、例えば、フルオロクロム、酵素による沈降または金属がある。

### 1. フルオロクロム

フルオロクロムは、適切な励起波長の光により励起されたときに特定の放出波長で蛍光を放出する化学化合物である。種々のフルオロクロム-ヌクレオチドを遺伝子プローブなどの同定剤に組込むことにより、多数の遺伝子プローブを用い

る *in situ* ハイブリダイゼーションを実施でき、種々のフルオロクロムそれぞれに適した励起波長の光を用いることにより、単一細胞中の多数のハイブリダイズ化プローブの存在を直接同定することが可能である。フルオロクロムはアビジン (またはストレプトアビジン) または抗体に接着してもよく、そうすればこれらは上記の免疫細胞化学的同定システムやビオチン-アビジン (またはストレプトアビジン) 同定システムにおいても使用可能である。

### 2. 酵素による沈降

免疫細胞化学で通常使用される2つの酵素は、アルカリホスファターゼと西洋ワサビペルオキシダーゼである。抗体またはアビジン（またはストレプトアビジン）にコンジュゲートさせた場合、これらの酵素は、プローブが結合している部位で局所化した発色生成物の沈降物を触媒し、次いで適切な基質を添加することにより、可視化を可能にする。

内因性アルカリホスファターゼおよびペルオキシダーゼがあれば、好ましくは免疫細胞化学の前に不活性化しておく。胎盤および腸組織中に見られる内因性アルカリホスファターゼは、例えば、レバミゾールまたは20%酢酸の添加により不活性化できる。内因性ペルオキシダーゼは、血液中の様々な細胞種中に見られるものであり、ホウ化水素、過ヨウ素酸塩 (periodate) またはフェニルヒドラジンによって不活性化できる。

### 3. 金属

抗体またはアビジン（またはストレプトアビジン）にコンジュゲートさせたコロイド状の金は、上記の両種の同定システムと共に使用できる。この金属によって、同定剤に結合させた標的細胞を光学顕微鏡または電子顕微鏡のいずれかにより目視できる。

上記シグナル生成システムを使用する方法は、当分野では知られており、例えば、A.R.Leitch等、In Situ Hybridization, Bios Scientific(1994), Oxford, England; B.D.Hames et al., Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (1998), IRL Press, Oxford, England) に論じられている。

## VIII. 強化細胞の評価

本発明により強化および同定される標的細胞は、更なる分析にも適している。分析の種類は、2つの広い範疇、無傷細胞の分析と細胞内成分の分析に分類される。

### A. 強化した無傷細胞の分析

強化および同定に続き、酵素による沈降あるいは金属シグナル生成システムのいずれかを採用した場合、細胞をスライド上に置いて光学顕微鏡で目視できる。蛍光標識で直接的または間接的に標識した同定剤を使用する場合、その結果は、

目視したい特定のフルオロクロムに適した波長放出フィルターを用いて蛍光顕微鏡で目視できる。細胞は、コンピューター制御蛍光ベースイメージ分析システムを用いて自動的に分析することもできる。

一般に、対象となる標的細胞は、細胞内の特定の核酸またはタンパク質産物の数種を発現できるものであり、これを用いて、対象の特定細胞種を強化する更なる手段を提供することができる。前述のように、本発明の方法は、知られている細胞外ハイブリダイゼーション法と組み合わせることもできる。従って、強化した細胞集団をもう一巡、他の細胞内または細胞外成分用の検出剤を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションおよび固相強化にかけることができる。

強化細胞はまた、ある細胞内成分に特異的なその他の検出剤を用いて、更に *in situ* ハイブリダイゼーション分析または蛍光活性化セルソーター処理にかけることもできる。例えば、胎児細胞を母体血液から強化した場合、標識化染色体特異的プローブおよび *in situ* ハイブリダイゼーションにより、胎児の染色体補体の情報を提供でき、その際に染色体異数性を同定することができる。

特定の細胞種を消失した混合細胞集団は、その集団中の他の特定細胞種を単離するために再利用できる。これは、この細胞集団中の他の細胞種のある細胞内成分に特異的な検出剤を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションおよび固相強化をもう一巡実施することにより達成できる。

#### B. 生化学的および遺伝子的分析

*in situ* ハイブリダイゼーションおよび固相強化によって濃縮させた細胞は、生化学的および遺伝子的分析に適している。例えば、細胞から抽出した核酸は、

分子生物学的技術、例えば、ノーザンおよびサザンブロッティング分析により分析して、強化細胞集団中に存在する特定の核酸配列を同定することができる。PCR 技術もまた、強化細胞集団中の特定の核酸配列を同定するのに使用できる。真核生物または細菌のプラスミドなどのエピソーム因子またはウイルスの核酸もまた、強化細胞から単離でき、更なる分析のために適切な宿主内へ再導入することができる。強化細胞から抽出されたタンパク質は、ウエスタンブロッティングによって分析できる。

当業者ならば、疾患の診断、予防および治療において、また更なる研究目的で、本発明の方法および強化細胞複合体が臨床使用できることは容易に認識できる。低濃度で存在する特定の細胞を確実に検出できるという能力は、例えば、胎児細胞を母体血液から強化することにより胎児の遺伝子異常の診断に対し安全かつ費用効率のよい手段を提供できる（例えば、M.Adinolfi, Prenatal Diagnosis 15:889-896(1995)参照）。この方法は、血液、リンパ球、骨髄または他の体液または組織中の標的細胞の存在に基づき癌性疾患の初期診断を提供でき、並びに、H I V、またはその他の感染ウイルス性、細菌性または寄生虫性の疾患のスクリーニングを提供できる。本発明は、様々な症状、例えば、熱疾患、前立腺癌、乳癌、白血病および遺伝的素質が要因であり得るその他の症状に対する個体の遺伝的素質を検出するための非侵襲的方法を提供することもできる。腫瘍、癌、肉腫および黒色腫からリンパ液へおよび循環系へと流れる細胞を検出する方法もまた提供でき、その際に、腫瘍転移の見込みについて予想することもできる。

更に、この方法の容易性と安全性により、例えば、抗菌処理、抗ウイルス処理および抗癌処理の治療効果の評価が侵襲性を最小限に抑えて実施できる。更に、標的細胞強化により混合細胞集団の標的細胞消失が起こるため、本発明によって、白血病、A I D Sなどの疾患、血液運搬寄生虫疾患およびある種の細胞の消失により改善され得る同様の疾患の新規処置法を導き得ることは予想できる。

発明者は、細胞外ベースの固相強化、蛍光活性化セルソーター処理および分子生物学的方法などの他の方法と本発明との併用もまた予知している。

#### I X. 固相強化キット

本発明は、更に、固相支持システムを用いて混合細胞集団から少なくとも1種の特定の細胞を強化する持ち運び可能な方法を提供する。持ち運び可能な強化システムは、1種またはそれ以上の特定細胞を強化するのに使用するために組立ててパッケージしておくことができるキット内に含めることができる。本発明のこの実施態様によれば、キットは、少なくとも固定剤、透過剤、検出剤および前述の固相支持システムを含むことができる。この固相支持システムには、持ち運び可能な固相支持体、例えば、磁化性粒子、シリカ、アガロース、デキストラン、

繊維支持体、セルロース、合成ポリマーおよび類似の支持体があり得る。キットは、更に、同定剤やシグナル生成システムを含んでいてもよい。

キットに含まれる固定剤や透過剤は、前述の薬剤ならばどれでもよい。更に、1種の特定細胞のみを同定する場合は、1種の検出剤のみを含めればよい。あるいは、複数の特定細胞種を検出するか、または複数の細胞内成分の存在に基づく1種の特定細胞種を検出する場合は、複数の検出剤を含めることができる。

下記の実施例は、本発明の実施の仕方を当業者に教示するために設けたものである。いずれにしても、これらは本発明の範囲を定義または限定することを意図していない。

## 実施例

### 実施例 1

モデル系における母親血液からの細胞内メッセンジャーRNA (mRNA) 遺伝子産物を用いた胎児細胞の強化

母親血液からの胎児細胞の強化はモデル系において行われ、その場合既知数の胎児栄養膜細胞（いわゆる合胞体層芽）を製造し、次いでそれらを母親血液に加え、次いで強化方法を用いて回収した。（C. S. Hawes, et al., From Fertilisation to Fetus: Detection of Geno-Pheno-Type Diversities, 219-223, H. Zalkut ed., (1994), Monduzzi Editore, Bologna, Italy）。

3種の検出剤を比較した。3- $\beta$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（3 $\beta$ HSD）遺伝子をコード化する435bp部分cDNAフラグメントを、EcoRI/BamHIでの制限消化によりプラスミドcDNAクローンpCMV5

H3 $\beta$ -HSD (Lorence et al., Endocrinology 126:2493-2498(1990))から切除した。ひと胎盤性ラクトゲンホルモン (hPL) 遺伝子をコードする1.2kb部分cDNAフラグメントを、EcoRIでの制限消化によりプラスミドcDNAクローンpN202 (18) (S. Latham et al., Prenatal Diagnosis, 16:813-821(1995))から切除した。PSG1遺伝子をコード化する0.9kb部分cDNAフラグメントを、EcoRIでの制限消化によりプラスミドcDNAクロー



npSP10.9 (S. Latham および B. Kalionis 未公開データ) から切除した。ベリンガー・マンハイムからのランダムプライム標識キット (DIG-ハイプライムキット、1995 カタログ番号 1-585-606) を用い、キットに含まれる製造会社の使用説明書に従って、各 DNA フラグメントをジゴキシゲニン-11-dUTP で個別標識した。

3  $\beta$  HSD 遺伝子、hPL 遺伝子および PSG1 遺伝子に対する遺伝子プローブとの *in situ* ハイブリダイゼーション実験において、これらの遺伝子プローブは合胞体芽に特異的であることを示し、血中で他の細胞とはあまりクロスハイブリダイゼーションを示さない (H. Suskin および B. Kalionis、未公開データ)。

最初のトリメスター (全妊娠期間の 3 分の 1) 胎盤組織を食塩水中に集めた。過剰の血液を食塩水でリンスし、20-30 ml 食塩水中室温で新たに得られた組織を激しく振盪することにより合胞体芽の懸濁液を製造した。この結果、合胞体芽が絨毛膜絨毛から散らばった。50  $\mu$ l アリコートの細胞懸濁液をスライドに落とし、風乾し、ヘマトキシリンで染色した。各アリコートにおける合胞体芽の総数を顕微鏡で計数することにより、1 アリコート当たりの平均数を測定した。例えば、典型的な一連の 5 アリコートにおいて得られた数は、68、70、71、71 および 72 であった。これから、約 50 の合胞体芽を含む懸濁液の体積を計算した (例、35  $\mu$ l)。

10 ml 管中で 50 の合胞体芽 (上記参照) を 20 ml のひと末梢血細胞に加え、次いで溶解緩衝液 (0.1 モルの  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 15 ミリモルの  $\text{NaHCO}_3$ 、0.1 ミリモルの  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) とインキュベーションすることにより赤血球細胞を溶かし、400  $\times$  g で 5 分間遠心分離し、溶解緩衝液中で 2 度目のインキュ

ベーションを行い、次いで 50 ml の冷食塩水で洗浄した。白血球細胞を臨床用遠心機において 400  $\times$  g で 10 分間遠心分離した (総数約  $10^8$  細胞が得られた)。室温で 10 分間 PBS 中 4% パラホルムアルデヒドに再懸濁することにより、細胞を固定した。400  $\times$  g で遠心分離を反復することにより、細胞をペレット化した。過剰の固定液を吸引により回収した。細胞ペレットを PBS 中で 5 分間洗浄し、再び遠心分離して細胞をペレット化した。PBS を吸引により除去

し、細胞をもう1回洗浄した。

次いで、37℃で10分間100 pg/mlでのプロテイナーゼKにより細胞の透過性を上昇した。室温で2分間PBS中0.2% (w/v) グリシンにより透過性を止めた。細胞を400×gでペレット化し、過剰のグリシンを除去した。次いで、細胞を上記と同様に4%パラホルムアルデヒド中で後一固定 (post-fixed) した。

細胞を上記と同様PBS、食塩水で2回洗浄し、細胞ペレットを、1種またはそれ以上の遺伝子プローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液に再懸濁した。ハイブリダイゼーション緩衝液は、60%ホルムアミド、2×SSC、25ミリのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4、5%デキストランスルフェート、250 μg/mlの音波処理した変性さけ精液DNAおよび5 ng/μl濃度の1種またはそれ以上のジゴキシゲニン標識ハイブリダイゼーション遺伝子プローブ含有の検出剤を含んでいた。細胞を再懸濁する前に、ハイブリダイゼーション緩衝液における標識遺伝子プローブは、80℃で10分間混合物をインキュベーションした後、氷上で5分間急冷却することにより変性させた。ハイブリダイゼーションは37℃で16時間行われた。臨床用遠心機中400×gで細胞をペレット化し、過剰のハイブリダイゼーション溶液を除去した。細胞を5分間室温で0.5×SSCにより2回洗浄し、次いで37℃で10分間0.5×SSCにより3度目洗浄した。細胞を再びペレット化し、5分間PBS中で洗浄した。

次いで特定の細胞を濃縮した。100分の1希釈のマウス抗ジゴキシゲニン抗体 (約0.4 μg) (1995カタログ番号1-333-062、バーリンガー・マンハイム、ドイツ国) を細胞に加えた。細胞を37℃で2～3時間抗体の存在

下でインキュベーションした。次いで、細胞をペレット化し、過剰抗体を吸引により除去し、上記と同様PBS中で2回洗浄した。細胞ペレットを20 μlのラット抗マウスIgG1-マイクロビーズ (1992カタログ番号271-01、ミルテニイ・ビオテック・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング、ドイツ国) に再懸濁し、4℃で15分間インキュベーションした。磁気カラム (1992カタログ番号211-02、A2型、ミルテニイ・ビオテック・ゲゼ

ルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング、ドイツ国) については、エタノール/エチルスルフェート/イソプロピルアルコール/シロキサンから成る混合物をカラムに通し、次いでカラムをPBSでリンスすることにより前処理した。次いで、カラムを強い磁場(1992カタログ番号231-02、MACSセパレーター、ミルテニイ・ビオテック・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング、ドイツ国) 中に置き、磁気ビーズ:細胞懸濁液をカラムに充填し、次いで5 mlのPBS/0.01%アジ化ナトリウム/1%BSA緩衝液で洗浄した。カラムを磁場から取り出し、2 mlのPBS/0.01%アジ化ナトリウム/1%BSA緩衝液で逆洗することにより、カラムに非特異結合した細胞があればそれらを除去した。カラムを磁場中に戻し、細胞をワイヤーメッシュへ移動させた。洗浄および逆洗処理を4回反復した。

磁石からカラムを除き、カラムに10 mlのPBS緩衝液を通すことにより、洗浄および逆洗後磁石に保持された濃縮細胞を溶離した。この溶離をもう1度反復した。次いで、溶離された細胞を5分間400×gで遠心分離することにより、細胞をペレット化した。

次いで、強化細胞を同定し、可視化した。ペレット細胞を約50  $\mu$ lのPBS緩衝液に再懸濁し、次いで顕微鏡スライド上に置き、風乾した。スライド上の細胞を20℃で30分間20%正常ヒツジ血清中でインキュベーションすることにより、2次抗体の非特異結合を遮断した。スライドをPBS中で短時間リンスした。標識2次抗体、ヒツジからの抗ジゴキシゲニン-ローダミンFabフラグメント(1995カタログ番号1-207-750、ベーリンガー・マンハイム、ドイツ国)を、1:10の希釈率で細胞に適用し、20℃で60分間インキュベ-

ーションすることにより、標的細胞を同定および可視化した。0.1%v/vノニデットP40(ベーリンガー・マンハイム、ドイツ国)を含むPBS中でスライドを2回洗浄した。抗フェードマウント(90%v/vのグリセリン、0.1%v/vのp-フェニレンジアミン)を、細胞標本に加え、次いでカバーガラスを適用した。次いで、615 nm放射波長のフィルターを用いる蛍光顕微鏡により細胞を検出し、蛍光細胞の総数を測定した。全標本を顕微鏡下で走査し、蛍

光合胞体芽を計数した。

表1 モデル系における合胞体芽の回収

遺伝子プローブ <sup>1</sup>	加えられた芽の数 <sup>2</sup>	芽の回収% <sup>3</sup>
3 $\beta$ HSD	50	38、46
hPL	50	36、48
PSG1	50	44
3 $\beta$ HSD、hPL	50	68
3 $\beta$ HSD、hPL PSG1	50	78
加えられた 遺伝子プローブ無し	50	2

1. 合胞体芽の回収に使用される遺伝子プローブ（複数も可）、
2. 加えられた合胞体芽の数、および
3. 遺伝子プローブ（複数も可）とのin situ ハイブリダイゼーションおよび固相強化後の合胞体芽の回収パーセンテージ。各数は1個体標本当たりの回収パーセンテージを表す。汚染白血球細胞（WBC）の回収パーセンテージは、標本の総WBC数（平均 $10^7$ 細胞/ml）と比較した磁気活性化セルソーター（MACS）溶出液において回収された数から計算され、どの場合も $<0.001\%$ であった（データは示さない）。

表1は、検出剤として遺伝子プローブおよび強化用固相支持体として超常磁性

粒子を用いて、母親血液における細胞の混合集団から合胞体芽が回収されたことを示している。合胞体芽の回収効率は多重遺伝子プローブの使用により改善された。

#### 実施例2

モデル系におけるIgH遺伝子用細胞内メッセンジャーRNA（mRNA）を用いた5T33骨髓腫細胞の強化。

骨髓腫は骨髓の造血組織から誘導される細胞の腫瘍である。骨髓腫腫瘍は、本来クローン性であり、大量の単一種抗体を分泌する。インビトロ培養セルラインは、5 T 3 3 骨髓腫腫瘍から確立された。L. S. Manning et al., Br. J. Cancer 66:1088-1093(1992)参照。骨髓腫セルラインでは、免疫グロブリン重鎖 (I g H) 遺伝子が高レベルで発現される。P C R プライマーを用いることにより、I g H 遺伝子のセグメントを特異増幅し、これを遺伝子プローブとして使用した。増幅に使用される P C R プライマーは、F R 1 5' - (G C) A G G T (C G) (A C) A (A G) C T G C A G (C G) A G T C T - 3' (配列番号1) および F R 4 5' - G G A G A C T C T G A G A G T G G T G - 3' (配列番号2) であった。

ベーリンガー・マンハイムからのランダムプライム標識キット (D I G-ハイプライムキット、1995カタログ番号1-585-606) を用い、キットに含まれる製造会社の使用説明書に従って、I g H P C R フラグメントをジゴキシゲニン-11-d U T P により標識した。I g H 遺伝子プローブとの *in situ* ハイブリダイゼーション実験は、このプローブが5 T 3 3 骨髓腫細胞に特異的であることを示しており、I g H 遺伝子プローブは、ヒト母親末梢血において他の細胞型とはあまりクロスハイブリダイゼーションを示さない (H. Suskin および B. Kalionis、未公表データ)。対照として、3  $\beta$  H S D 遺伝子に対する遺伝子プローブを使用した。3  $\beta$  H S D 遺伝子に対する遺伝子プローブは、ヒト母親末梢血における細胞または5 T 3 3 骨髓腫細胞と特定クロスハイブリダイゼーションを示さない (H. Suskin および B. Kalionis、未公表データ)。3  $\beta$  H S D 遺伝子用の遺伝子プローブは、正確に上記実施例1の記載に従い製造された。

5 T 3 3 骨髓腫細胞培養ラインを生長させ、当業界公知の方法を用いて採取した。(例えば、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique(R.I., Freshney ed. 1987), Wiley-Lis, New York, USA、参照)。

約1000の5 T 3 3 骨髓腫細胞を20mlのヒト母親末梢血細胞に加え、次いで溶解緩衝液(0.1モルのNH<sub>4</sub>Cl、15ミリモルのNaHCO<sub>3</sub>、0.1ミリモルのNa<sub>2</sub>EDTA)とインキュベーションすることにより、赤血球細胞を

溶解し、5分間 $400\times g$ で遠心分離し、再び溶解緩衝液中でインキュベーションし、次いで50mlの冷食塩水で洗浄した。白血球細胞を臨床用遠心機において10分間 $400\times g$ で遠心分離にかけた（総数約 $10^8$ 細胞が得られた）。室温で10分間PBS中4%パラホルムアルデヒドに再懸濁することにより、細胞を固定した。遠心分離を $400\times g$ で反復することにより、細胞をペレット化した。過剰の固定液を吸引により除去した。細胞ペレットをPBS中で洗浄し、再び遠心分離にかけることにより細胞をペレット化した。PBSを吸引により除去し、細胞をもう1度洗浄した。

次いで、 $37^{\circ}\text{C}$ で10分間 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ でのプロテイナーゼKにより細胞の透過性を上昇した。室温で2分間PBS中0.2% (w/v) グリシンにより、透過性を止めた。次いで、細胞を上記要領で4%パラホルムアルデヒドに最終固定した。細胞をPBSによりさらに2回洗浄し、上記と同様ペレット化した。

60%ホルムアミド、 $2\times\text{SSC}$ 、25ミリモルの $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.4、5%デキストランスルフェート、 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ の音波処理した変性さけ精液DNAおよび $5\text{ng}/\mu\text{l}$ 濃度のジゴキシゲニン標識ハイブリダイゼーション遺伝子プローブ含有の検出剤を含むハイブリダイゼーション緩衝液に細胞を再懸濁した。細胞を再懸濁する前、ハイブリダイゼーション緩衝液中、標識遺伝子プローブについて、混合物を $80^{\circ}\text{C}$ で10分間インキュベーションした後、氷上で5分間急速冷却することにより変性させた。ハイブリダイゼーションは $37^{\circ}\text{C}$ で16時間行った。臨床用遠心分離機において $400\times g$ で細胞をペレット化し、過剰のハイブリダイゼーション溶液を除去した。細胞を室温で5分間 $0.5\times\text{SSC}$ 中で2回洗浄し、次いで3度目 $37^{\circ}\text{C}$ で10分間 $0.5\times\text{SSC}$ 中で洗浄した。

細胞を再びペレット化し、PBS中で5分間洗浄した。

次いで、特定の細胞を濃縮した。100分の1希釈のマウス抗ジゴキシゲニン抗体（約 $0.4\mu\text{g}$ ）（1995カタログ番号1-333-062、ベーリンガー・マンハイム、ドイツ国）を細胞に加えた。細胞を $37^{\circ}\text{C}$ で2～3時間抗体の

存在下でインキュベーションした。次いで、細胞をペレット化し、過剰の抗体を吸引により除去し、上記と同様PBS中で2回洗浄した。細胞ペレットを20  $\mu$  lのラット抗マウスIgG1-マイクロビーズ(1992カタログ番号271-01、ミルテニイ・ビオテック・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング、ドイツ国)に再懸濁し、4℃で15分間インキュベーションした。磁気カラム(1992カタログ番号211-02、A2型、ミルテニイ・ビオテック・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング、ドイツ国)については、エタノール/エチルスルフェート/イソプロピルアルコール/シロキサンから成る混合物をカラムに通し、次いでカラムをPBSでリンスすることにより前処理した。次いで、カラムを強い磁場(1992カタログ番号231-02、MACSセパレーター、ミルテニイ・ビオテック・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング、ドイツ国)中に置き、磁気ビーズ:細胞懸濁液をカラムに充填し、次いで5 mlのPBS/0.01%アジ化ナトリウム/1%BSA緩衝液で洗浄した。カラムを磁場から取り出し、2 mlのPBS/0.01%アジ化ナトリウム/1%BSA緩衝液で逆洗することにより、カラムに非特異結合した細胞があればそれらを除去した。カラムを磁場中に戻し、細胞をワイヤーメッシュへ移動させた。洗浄および逆洗処理を4回反復した。磁石からカラムを除き、カラムに10 mlのPBS緩衝液を通すことにより、洗浄および逆洗後磁石により保持された濃縮細胞を溶離した。この溶離をもう1度反復した。次いで、溶離された細胞を5分間400  $\times$  gで遠心分離することにより、細胞をペレット化した。

次いで、強化細胞を同定し、可視化した。沈澱した細胞を約50  $\mu$  lのPBS緩衝液に再懸濁し、次いで顕微鏡スライド上に置き、風乾した。スライド上の細胞を20℃で30分間20%正常ヒツジ血清中でインキュベーションすることにより、2次抗体の非特異結合を遮断した。スライドをPBS中で短時間リンスし

た。標識2次抗体、ヒツジからの抗ジゴキシゲニン-ローダミンFabフラグメント(1995カタログ番号1-207-750、ベーリンガー・マンハイム、ドイツ国)を、1:10の希釈率で細胞に適用し、20℃で60分間インキュベ

ーションした。0.1% v/v ノニデット P 4 0 (ベーリンガー・マンハイム、ドイツ国) を含む P B S 中でスライドを 2 回洗浄した。抗フェードマウント (90% v/v のグリセリン、0.1% V/V の P-フェニレンジアミン) を細胞標本に加え、次いでカバーガラスを適用した。次いで、615 nm 放射波長のフィルターを用いた蛍光顕微鏡により細胞を検出し、蛍光細胞の総数を測定した。

表 2 モデル系における 5 T 3 3 骨髄腫細胞の回収

遺伝子プローブ <sup>1</sup>	加えられた 5 T 3 3 骨髄腫細胞の数 <sup>2</sup>	5 T 3 3 骨髄腫細胞の回収率 <sup>3</sup>
I g H	1 0 0 0	87、85、93
I g H	0	0.06、0.07
3 $\beta$ H S D	1 0 0 0	0.04

1. 5 T 3 3 骨髄腫細胞の回収に使用される遺伝子プローブ (複数可)、
2. 加えられた 5 T 3 3 骨髄腫細胞の数、および
3. 遺伝子プローブとの *in situ* ハイブリダイゼーションおよび固相強化後の蛍光 5 T 3 3 骨髄腫細胞の回収パーセンテージ。各数は 1 個体標本当たりの回収パーセンテージを表す。汚染白血球細胞 (W B C) の回収パーセンテージは、標本の総 W B C 数 (平均  $10^7$  細胞/ml) と比較した M A C S 溶出液において回収された数から計算され、どの場合も  $<0.001\%$  であった (データは示されず)。

表 2 は、検出剤として遺伝子プローブおよび強化用固相支持体として超常磁性粒子を用いて、母親血液における細胞の混合集団から 5 T 3 3 骨髄腫細胞が回収されたことを示している。細胞の回収は母親血液への 5 T 3 3 骨髄腫細胞の付加に依存的であった。3  $\beta$  H S D 遺伝子プローブはまた、母親細胞または 5 T 3 3

骨髄腫細胞においても発現されないものであり、細胞の回収が非常に低いことから、細胞の回収が特定の遺伝子プローブの付加に依存的であることを示していた。



## 実施例 3

モデル系を用いた強化前における、液体中での *in situ* PCR 増幅による細胞内核酸標的配列の増幅。

ヒト栄養膜細胞層セルライン、HTR 8 (C. H. Graham et al., *Experimental Cell Research*, 206:204-211(1993))は、転写因子遺伝子 *Dlx-4* (L. Quinn and B. Kalionis, *Gene*, 投稿中(1997))を発現する。HTR 8細胞を培養中で生長させ、採取する(C. H. Graham et al., *Experimental Cell Research*, 206:204-211(1993))。次いで、細胞(約  $10^5 - 10^6$  細胞総数)を室温で10分間PBS中4%パラホルムアルデヒドに再懸濁することにより固定する。細胞を  $400 \times g$  で遠心分離にかけることにより、細胞をペレット化する。過剰の固定液を吸引除去し、細胞ペレットをPBS中で5分間洗浄し、再び遠心分離にかけて細胞をペレット化する。

次いで、 $37^\circ\text{C}$  で10分間  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  でのプロテイナーゼK処理により細胞の透過性を上昇する。室温で2分間PBS中0.2% (w/v) グリシンにより透過性を止める。細胞を  $400 \times g$  でペレット化し、過剰のグリシンを除去する。次いで、細胞を室温で10分間PBS中4%パラホルムアルデヒドに後固定する。細胞を  $400 \times g$  でペレット化し、過剰の固定液を吸引除去する。細胞ペレットをPBS中で5分間洗浄し、再び遠心分離にかけて細胞をペレット化する。

50ミリモルのKCl、20ミリモルのトリス-HCl (pH 8.4)、2.5ミリモルのMgCl<sub>2</sub>、0.1mg/mlの牛血清アルブミン、1ミリモルの各dNTP、1単位/ $\mu\text{l}$ でのRNアシン阻害剤(プロメガ・コーポレーション、ユーエスエー)、100ピコモルのランダム6量体オリゴヌクレオチドおよび200単位のMoMuLV (またはAMV) 逆転写酵素を含む緩衝液  $100 \mu\text{l}$  に細胞を再懸濁する。この反応物を室温で10分間、次いで  $37^\circ\text{C}$  で60分間インキュベーションする。5分間  $95^\circ\text{C}$  で加熱することにより、反応を終結させる。次いで

で、細胞を  $400 \times g$  でペレット化し、過剰の溶液を吸引除去する。10ミリモ

ルのトリス-HCl (pH 8.4)、1.5ミリモルのMgCl<sub>2</sub>、50ミリモルのKCl、各200マイクロモルのdGTP、dCTP、dATP、190マイクロモルのdTTP、10マイクロモルのジゴキシゲニン-11-dUTP、1-2単位のTaqポリメラーゼ、100μg/mlのゼラチンおよび各0.25マイクロモルのDlx-4特定31k sプライマー (5'-AGTCTTCCGGGTGGAGC-3') (配列番号3) およびDlx-4特定31k sプライマー (5'-GTCACCTATCAGCGCTGC-3') (配列番号4) を含む緩衝液100μlに細胞を再懸濁する (L. Quinn and B. Kalionis, Gene、投稿中(1997))。標本に75μlの鉱油を重層し、温度を5分間95℃に上昇させ、細胞における核酸を変性させる。次いで、細胞を1分間95℃、1分間52℃および1.5分間72℃から成る30サイクルにかける。10分間72℃での最終拡張でサイクルを完結させる。4℃に冷却し、EDTAを加えて10ミリモルにすることにより、反応を終結させる。次いで、細胞を400Xgでペレット化し、PBS中4%パラホルムアルデヒドに再懸濁し、室温で10分間インキュベーションすることにより、細胞を固定する。

増幅後、約1000のHTR8細胞を20mlのヒト末梢血細胞に加え、溶解緩衝液 (0.1モルのNH<sub>4</sub>Cl、15ミリモルのNaHCO<sub>3</sub>、0.1ミリモルのNa<sub>2</sub>EDTA) とインキュベーションすることにより赤血球細胞を溶かし、400Xgで5分間遠心分離し、溶解緩衝液中で2度目のインキュベーションを行い、次いで50mlの冷食塩水で洗浄する。細胞を臨床用遠心機において400Xgで10分間遠心分離する (総数約10<sup>8</sup>細胞が得られる)。室温で10分間PBS中4%パラホルムアルデヒドに再懸濁することにより、細胞を固定する。400Xgで遠心分離を反復して、細胞をペレット化する。過剰の固定液を吸引除去する。細胞ペレットをPBS中で洗浄し、再び遠心分離して細胞をペレット化する。過剰のPBSを吸引により除去し、細胞をもう1回洗浄する。

次いで、37℃で10分間10-100μg/mlでのプロテイナーゼK処理により細胞の透過性を上昇する。室温で2分間PBS中0.2% (w/v) グリ

シンにより透過性を止める。次いで、細胞を上記に従い4%パラホルムアルデ

ヒドに後一固定 (post-fixed) する。細胞を上記要領でさらに2回PBSで洗浄し、ペレット化する。

次いで標的細胞を濃縮する。100分の1希釈のマウス抗ジゴキシゲニン抗体 (約 $0.4\mu\text{g}$ ) (1995カタログ番号1-333-062、ベーリンガー・マンハイム、ドイツ国) を細胞に加える。細胞を $37^{\circ}\text{C}$ で2~3時間抗体の存在下でインキュベーションする。次いで、細胞をペレット化し、過剰抗体を吸引により除去し、細胞を上記と同様PBS中で2回洗浄する。細胞ペレットを $20\mu\text{l}$ のラット抗マウスIgG1-マイクロビーズ (1992カタログ番号271-01、ミルテニイ・ビオテック・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング、ドイツ国) に再懸濁し、 $4^{\circ}\text{C}$ で15分間インキュベーションする。磁気カラム (1992カタログ番号211-02、A2型、ミルテニイ・ビオテック・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング、ドイツ国) については、エタノール/エチルスルフェート/イソプロピルアルコール/シロキサンから成る混合物をカラムに通し、次いでカラムをPBSでリンスすることにより前処理する。次いで、カラムを強い磁場 (1992カタログ番号231-02、MACSセパレーター、ミルテニイ・ビオテック・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング、ドイツ国) 中に置き、磁気ビーズ：細胞懸濁液をカラムに充填し、次いで5mlのPBS/0.01%アジ化ナトリウム/1%BSA緩衝液で洗浄する。カラムを磁場から取り出し、2mlのPBS/0.01%アジ化ナトリウム/1%BSA緩衝液で逆洗することにより、カラムに非特異結合した細胞があればそれらを除去する。カラムを磁場中に戻し、細胞をワイヤーメッシュへ移動させる。洗浄および逆洗処理を4回反復する。洗浄および逆洗後磁石により保持された細胞を磁石からカラムを除き、次いでカラムに10mlの緩衝液を通すことにより溶離する。この溶離をもう1度反復する。次いで、溶離された細胞を5分間 $400\times g$ で遠心分離することにより、細胞をペレット化する。

ペレット細胞を約 $50\mu\text{l}$ のPBS緩衝液に再懸濁し、次いで顕微鏡スライド上に置き、風乾する。スライド上の細胞を $20^{\circ}\text{C}$ で30分間20%正常ひつじ血

清中でインキュベーションすることにより、2次抗体の非特異結合を遮断する。スライドをPBS中で短時間リンスする。標識2次抗体、ヒツジからの抗ジゴキシゲニン-ロダミンFabフラグメント（1995カタログ番号1-207-750、ベリンガー・マンハイム、ドイツ国）を、1:10の希釈率で細胞に適用し、20℃で60分間インキュベーションする。0.1%v/vノニデットP40（ベリンガー・マンハイム、ドイツ国）を含むPBS中でスライドを2回洗浄する。抗フェードマウント（90%v/vのグリセリン、0.1%v/vのp-フェニレンジアミン）を、細胞標本に加え、次いでカバーガラスを適用する。次いで、615nm放射波長のフィルターを用いて蛍光顕微鏡により細胞を検出し、蛍光細胞の総数を測定する。

#### 実施例4

モデル系におけるおよび患者標本からの前立腺細胞で発現された細胞内メッセンジャーRNA（mRNA）を用いた細胞の強化。

LNCaP細胞（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションCCCL-1740 LNCaP, FGC転移性前立腺癌、ヒト）は、もともと転移性前立腺癌患者から採取した上室リンパ節の針吸引生検から単離された細胞に由来するインビトロ培養セルラインである（Gibaz, Z. et al., Cancer Genet. Cytogenet. 11:399-404, 1984）。これらの細胞は、高レベルでアンドロゲンレセプター（AR）に関する遺伝子を発現する。

PCRプライマーを用いて、AR遺伝子セグメントを増幅し、遺伝子プローブとして使用した。750bpのAR PCRフラグメントは、プライマー：ARCS1 5'-TGAAGCAGGGATGACTCTGGG-3'（配列番号5）およびARCAS4 5'-CTCGCAATAGGCTGCACGGAG-3'（配列番号6）[2016-2766位、Tilley et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(1):327-331(1989)]を用いたPCR増幅により製造された。これらのプライマーにより生成された750bpフラグメントを、Bluescriptプラスミドベクター（ストラタジーン、アメリカ合衆国）のSmaI部位へサブクローニングし、プラスミドDNAを製造した。この挿入断片はEcoRIおよびB

a m H I での制限消化後単離されたもので、単離された挿入断片を、ベーリンガー・マンハイムからのランダムプライム標識キット (DIG-ハイプライムキット、1995カタログ番号1-585-606) を用い、キットに含まれる製造会社の使用説明書に従って、ジゴキシゲニン-11-d UTPにより標識した。

LNCaP細胞培養ラインを、当業界公知の方法を用いて生長させ、採取した (In "Culture of Animal Cells: a manual of basic technique" (1987), Freshney, R. I. (ed., Wiley-Liss, New York, USA) )。

約1000のLNCaP細胞を正常ヒト男性血液細胞の20ml試料に加えた。良性前立腺過形成患者から採取した3つの他のヒト男性血液試料を使用した (各々約10ml)、これらの試料にはLNCaP細胞を加えなかった。次いで、血液試料を溶解緩衝液 (0.1モルの $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、15ミリモルの $\text{NaHCO}_3$ 、0.1ミリモルの $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) とインキュベーションすることにより、赤血球細胞を溶解し、5分間400gで遠心分離し、再び溶解緩衝液中でインキュベーションし、次いで50mlの冷蔵塩水で洗浄した。白血球細胞を臨床用遠心機において10分間400gで遠心分離にかけた。室温で10分間PBS中4%パラホルムアルデヒドに再懸濁することにより、細胞を固定した。遠心分離を400gで反復することにより、細胞をペレット化した。過剰の固定液を吸引により除去した。細胞ペレットをPBS中で洗浄し、再び遠心分離にかけることにより細胞をペレット化した。PBSを吸引により除去し、細胞をもう1度洗浄した。

次いで、37℃で5分間100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でのプロテイナーゼK処理により細胞の透過性を上昇した。室温で2分間PB中0.2% (w/v) グリシンにより、透過性を止め、次いで細胞を上記と同様PBS中で2回洗浄した。細胞を上記要領で4%パラホルムアルデヒドに後一固定した。細胞をPBSによりさらに2回洗浄し、上記と同様ペレット化した。

50%ホルムアミド、2×SSC、25ミリモルの $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.4、5%デキストランスルフェート、250g/mlの音波処理した変性さけ精液DNAおよび5ng/ $\mu\text{l}$ 濃度のジゴキシゲニン標識ハイブリダイゼーション遺伝子プローブ含有の検出剤を含むハイブリダイゼーション緩衝液に細胞を再懸濁し

た。細胞を再懸濁する前、ハイブリダイゼーション緩衝液中、標識遺伝子プローブについては、混合物を80℃で10分間インキュベーションした後、氷上で5分間急速冷却することにより変性させた。ハイブリダイゼーションは、37℃で16時間行われた。臨床用遠心分離機において400×gで細胞をペレット化し、過剰のハイブリダイゼーション溶液を除去した。細胞を室温で5分間0.5×SSC中で2回洗浄し、次いで3度目37℃で15分間0.5×SSC中で洗浄した。細胞を再びペレット化し、PBS中で5分間洗浄した。

次いで、特定の細胞を濃縮した。10% v/v ヒツジ血清を含む500分の1希釈のマウス抗ジゴキシゲニン抗体(約0.4 g) (1995カタログ番号1-333-062、ベーリンガー・マンハイム、ドイツ国)を細胞に加えた。細胞を4℃で3時間抗体の存在下でインキュベーションした。次いで、細胞をペレット化し、過剰の抗体を吸引により除去し、細胞を上記と同様PBS中で2回洗浄した。細胞ペレットを20 μlのラット抗マウスIgG1-マイクロビーズ(1992カタログ番号27-01、ミルテニイ・ビオテック・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング、ドイツ国)に再懸濁し、4℃で15分間インキュベーションした。磁気カラム(1992カタログ番号211-02、A2型、ミルテニイ・ビオテック・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング、ドイツ国)については、エタノール/エチルスルフェート/イソプロピルアルコール/シロキサンから成る混合物をカラムに通し、次いでカラムをPBSでリンスすることにより前処理した。次いで、カラムを強い磁場(1992カタログ番号231-02、MACSセパレーター、ミルテニイ・ビオテック・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング、ドイツ国)中に置き、磁気ビーズ：細胞懸濁液をカラムに充填し、次いで5 mlのPBS/0.01%アジ化ナトリウム/1%BSA緩衝液で洗浄した。カラムを磁場から取り出し、2 mlのPBS/0.01%アジ化ナトリウム/1%BSA緩衝液で逆洗することにより、カラムに非特異結合した細胞があればそれらを除去した。カラムを磁場中に戻し置き、細胞をワイヤーメッシュへ移動させた。洗浄および逆洗処理を4回反復した。磁石からカラムを除き、カラムに10 mlのPBS緩衝液を通すことにより、

洗浄および逆洗後磁石により保持された濃縮細胞を溶離した。この溶離をもう1度反復した。次いで、溶離された細胞を5分間400gで遠心分離することにより、細胞をペレット化した。

ペレット細胞を約50 $\mu$ lのPBS緩衝液に再懸濁し、次いで顕微鏡スライド上に置き、風乾した。スライド上の細胞を20℃で30分間20%正常ヒツジ血清中でインキュベーションすることにより、2次抗体の非特異結合を遮断した。スライドをPBS中で短時間リンスした。標識2次抗体、ヒツジからの抗ジゴキシゲニン-ローダミンFabフラグメント(1995カタログ番号1-207-750、ベーリンガー・マンハイム、ドイツ国)を1:10の希釈率で細胞に適用し、20℃で60分間インキュベーションした。0.1%v/vノニデットP40(ベーリンガー・マンハイム、ドイツ国)を含むPBS中でスライドを2回洗浄した。抗フェードマウント(90%v/vのグリセリン、0.1%v/vのp-フェニレンジアミン)を細胞標本に加え、次いでカバーガラスを適用した。次いで、615nm放射波長のフィルターを用いた蛍光顕微鏡により細胞を検出し、強度蛍光細胞の総数を測定した。

表3

モデル系におけるおよび患者標本からのAR陽性細胞の回収。

標本	加えられたLNCaP細胞の数 <sup>a</sup>	計数された細胞の数 <sup>b</sup>
正常男性	1000	852
患者981	0	18
患者982	0	123
患者983	0	12

注：

a 加えられたLNCaP細胞の数。

b 750bp ARプローブとのin situ ハイブリダイゼーションおよび固相強化後に計数された強度蛍光細胞の数。

表3は、検出剤として750bp ARジゴキシゲニン標識遺伝子プローブおよび強化用固相支持体として超常磁性粒子を用いて、LNCaP細胞が正常ヒト男性血液における細胞の混合集団から回収されたことを示している。患者標本981、982および983は、AR陽性細胞が前立腺疾患の男性から採取した末梢血から検出され得ることを示している。

明細書中に記載の特許および出版物は全て、本発明が関係する技術分野の通常熟練者のレベルを示している。これらの特許および出版物は全て、個々の特許および出版物が各々具体的および個々に参考として示されている場合と同じく、同程度まで引用されて本明細書の一部となっている。

本発明において、添付された「請求の範囲」の精神および範囲から逸脱すること無く、多くの改変および修正が為され得ることは、当業界の通常の熟練者にとっては自明の理である。



## 配列表

## (1) 一般的情報:

(i) 出願人: カリオニス, ビル

(ii) 発明の名称: 細胞内成分を用いる無傷細胞の固相強化

(iii) 配列の数: 6

(iv) 住所:

(A) 受信人: DAVIES COLLISON CAVE

(B) 通り: リトル・コリンズ・ストリート1番

(C) 市: メルボルン

(D) 州: ビクトリア

(E) 国: オーストラリア

(F) 郵便番号: 3000

(v) コンピューター読み取り可能形式

(A) 媒体形: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC互換性

(C) オペレーティング システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) 現出願のデータ:

(A) 出願番号:

(B) 出願日: 1997年1月17日

(vi) 優先権主張出願のデータ:

(A) 出願番号: 60/010113

(B) 出願日: 1996年1月17日

(vii) 代理人情報:

(A) 氏名: Slattery, John M.

(B) 登録番号:

(C) レファレンス/ドケット番号: 1870760

## (ix) 遠距離通信情報:

(A) 電話: +613 9254 2777

(B) ファックス: +613 9254 2770

## (2) 配列番号1の情報:

## (i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 21塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA

(xi) 配列番号1の記載:

(G/C) AGGT (C/G) (A/C) A (A/G) C TGCAG (C/G) AGTC T

21

## (2) 配列番号2の情報:

## (i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 19塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA

(xi) 配列番号2の記載:

GGAGACTGTGAGAGTGGTG

19

## (2) 配列番号3の情報:

## (i) 配列の特性:

(A) 配列の長さ: 17塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA

(xi) 配列番号3の記載：

AGTCTTCCGGGTGGAGC

17

(2) 配列番号4の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：17塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA

(xi) 配列番号4の記載：

GTCACTATCAGCGCTGC

17

(2) 配列番号5の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：21塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA

(xi) 配列番号5の記載：

TGAAGCAGGGATGACTCTGG G

21

(2) 配列番号6の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：21塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA

(xi) 配列番号6の記載：

CTCGCAATAG GCTGCACGGA G

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/AU 97/00020

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int Cl <sup>6</sup> : C12N-5/00 C12N-11/00, C12Q-1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IC6: C12N-011, C12Q-001/68-keywords as below		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Medline: see keywords below		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Keywords: (intracellular, cytoplasmic) permeabilize, immobilize, hybridization WPAT, USPM, JAPIO, Chem Abs		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A1, 93/22053 (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 11 November 1993, see particularly example 10	
A	<u>Analytical Biochemistry</u> volume 228, 1995, pages 252-258 Gibellini, D. <i>et al</i>	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See parent family annex		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report 24 Mar 1997
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN INDUSTRIAL PROPERTY ORGANISATION PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA Facsimile No.: (06) 285 3929		Authorized officer JOHN ASHMAN Telephone No.: (06) 283 2364

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/AU 97/00020

**Box I** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

**Box II** Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/AU 97/00020

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/AU 97/00020

Box



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International Application No.  
**PCT/AU 97/00020**

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report				Patent Family Member			
WO	9222053	AU	17625/92	BR	9205581	CA	2095919
		EP	586452	GB	9111621	GB	9211223
		GB	2256395	IL	102049	JP	6508935

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	
G 0 1 N 33/543	5 1 5	C 1 2 N 5/00	E

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, S Z, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, G E, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, P L, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

テーマコード(参考)